



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**



**MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**Especialidade de Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional**

***Chlamydia trachomatis***

**Infecção na grávida e no recém-nascido**

**Cristina Isabel dos Santos Paixão Lobato**

2010





UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



*Chlamydia trachomatis*

**Infecção na grávida e no recém-nascido**

Cristina Isabel dos Santos Paixão Lobato

*Tese apresentada para a obtenção do grau de*

*Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade*

*de Biologia Molecular em Medicina Tropical*

*e Internacional*

Orientador: Professora Doutora Filomena Martins Pereira

Co-Orientador: Professora Doutora Rita Castro

2010

## Agradecimentos

À Professora Doutora Filomena Pereira, Directora da Unidade de Doenças Sexualmente Transmissíveis do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, por me ter recebido na unidade, e orientado no delineamento e toda a concepção do estudo.

À Professora Doutora Rita Castro por todo o apoio a nível laboratorial e de construção e pesquisa teórica.

À Prof. Emilia Prieto e à TACSP Teresa Veneno por toda a colaboração no processamento das amostras, que tornou possível a obtenção dos resultados em tempo útil.

À Doutora Irina Ramilo, médica obstetra no Hospital Amadora Sintra, pela disponibilidade que demonstrou na construção de toda a base de dados referente às gestantes incluídas no estudo.

À Técnica Coordenadora Teresa Geada, do Hospital Distrital de Santarém, por todo o apoio e disponibilidade demonstrada.

# Índice Geral

|   |      |
|---|------|
| Agradecimentos.....   | i    |
| Índice Geral.....   | ii   |
| Índice de Figuras.....  | vi   |
| Índice de Tabelas.....  | viii |
| Índice de Gráficos.....   | xi   |
| Abstract.....   | xii  |
| Abreviaturas.....   | xiv  |
| <br>  |      |
| I- Introdução.....  | 1    |
| 1- Género <i>Chlamydia</i> .....  | 1    |
| 2- <i>Chlamydia trachomatis</i> .....                                   | 2    |
| 2.1- A célula.....  | 2    |
| 2.2- Ciclo de vida.....   | 3    |
| 2.3- Genoma.....  | 5    |
| 2.4- Serovares de <i>C. trachomatis</i> .....                           | 8    |
| 3- Infecção por <i>C. trachomatis</i> .....                             | 10   |
| 3.1- Infecção associada aos serovares A-C.....                          | 10   |
| 3.2- Infecções e sequelas associadas aos serovares D-K.....             | 11   |
| 3.3- Infecção associada aos serovares L.....                            | 13   |
| 3.4- Tratamento.....  | 14   |
| 4- Diagnóstico Laboratorial da Infecção por <i>C. trachomatis</i> ..... | 15   |

Cristina Isabel dos Santos Paixão Lobato

|   |        |
|---|--------|
| 4.1- Tipo de amostra, colheita e transporte.....  | 16     |
| 4.2- Cultura Celular.....   | 17     |
| 4.3- Pesquisa de Antígenos de <i>C. trachomatis</i> .....   | 18     |
| 4.4- Pesquisa de Anticorpos Anti- <i>C. trachomatis</i> .....                                     | 19     |
| 4.5- Pesquisa de Ácidos Nucleicos.....  | 20     |
| 4.5.1- Hibridação de Ácidos Nucleicos.....  | 20     |
| 4.5.2- Técnicas de Amplificação de Ácidos Nucleicos.....  | 21     |
| 4.6- Serotipagem de <i>C. trachomatis</i> .....   | 25     |
| 5- Epidemiologia.....   | 26     |
| 6- Infecção por <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....  | 33     |
| <br>II- Objectivos.....   | <br>41 |
| <br>III- Materiais e Métodos.....   | <br>42 |
| 1- População.....   | 42     |
| 2- Métodos.....   | 43     |
| 2.1- Colheita de amostras na grávida.....   | 43     |
| 2.2- Colheita de amostras no recém-nascido.....   | 44     |
| 2.3- Preparação da amostra.....   | 44     |
| 2.4- Extração de ADN.....   | 44     |
| 2.5- Identificação de <i>C. trachomatis</i> por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos...46 |        |
| 2.5.1- Polimerase Chain Reaction (PCR) <i>multiplex</i> .....                                     | 46     |
| 2.5.1.1- Descrição dos primers.....   | 46     |

|   |    |
|---|----|
| 2.5.1.2- Preparação da mistura de reacção.....            | 49 |
| 2.5.1.3- Reacção de PCR.....                              | 50 |
| 2.5.1.4- Electroforese.....                               | 51 |
| 2.5.2- Técnica de PCR <i>multiplex</i> em tempo real..... | 52 |
| 2.5.2.1- Descrição dos primers e das sondas.....          | 52 |
| 2.5.2.2- Preparação da mistura de reacção.....            | 52 |
| 2.5.2.3- Reacção de PCR.....                              | 53 |
| 2.5.3- Técnica de <i>nested</i> PCR.....                  | 55 |
| 2.5.3.1- <i>Outer</i> - PCR.....                          | 55 |
| 2.5.3.1.1- Descrição dos primers.....                     | 55 |
| 2.5.3.1.2- Preparação da mistura de reacção.....          | 56 |
| 2.5.3.1.3- Reacção de PCR.....                            | 57 |
| 2.5.3.2- <i>Inner</i> - PCR.....                          | 58 |
| 2.5.3.2.1- Descrição dos primers.....                     | 58 |
| 2.5.3.2.2- Preparação da mistura de reacção.....          | 58 |
| 2.5.3.2.3- Reacção de PCR.....                            | 59 |
| 2.5.3.2.4- Electroforese.....                             | 60 |
| 2.5.4- Sequenciação.....                                  | 61 |
| 2.6- Identificação de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....  | 61 |
| 2.6.1- PCR.....   | 62 |
| 2.6.1.1-Descrição dos primers.....                        | 62 |
| 2.6.1.2- Preparação da mistura de reacção.....            | 63 |
| 2.6.1.3- Reacção de PCR.....                              | 64 |

|   |     |
|---|-----|
| 2.6.1.4- Electroforese.....   | 65  |
| 2.6.2- PCR em tempo real.....   | 66  |
| 2.6.2.1-Descrição dos primers.....  | 66  |
| 2.6.2.2- Preparação da mistura de reacção.....                                    | 67  |
| 2.6.2.3- Reacção de PCR.....  | 67  |
| 2.6.3- <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP).....                | 68  |
| IV- Resultados.....   | 70  |
| 1- Caracterização da população em estudo.....                                     | 70  |
| 2- Pesquisa de ADN de <i>N. gonorrhoeae</i> .....                                 | 71  |
| 3- Pesquisa de ADN de <i>C. trachomatis</i> .....                                 | 72  |
| 4- Pesquisa de ADN de <i>C. trachomatis</i> por técnica de <i>nested</i> PCR..... | 76  |
| 5- Genotipagem.....   | 79  |
| V- Discussão e Conclusão.....   | 80  |
| VI- Bibliografia.....   | 96  |
| VII- Anexos.....  | 111 |
| Anexo A- Consentimento informado.....   | 112 |
| Anexo B- Inquérito às grávidas.....   | 116 |



## Índice de Figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Ciclo de vida de <i>C. trachomatis</i> . 1- Adesão e entrada dos corpos elementares na célula epitelial susceptível; 2- Corpos reticulares dentro dos vacúolos; 3- Passagem dos corpos elementares para corpos reticulares; 4- ; 5- ; 6- libertação dos corpos elementares. Adaptado de: <a href="http://www2a.cdc.gov/stdtraining/self-study/chlamydia/Clam-SB6.asp&amp;usg=__PeWiMhzs-VIM8o90s4awFZFfJtA=&amp;h=540&amp;w=720&amp;sz=51&amp;hl=pt-PT&amp;start=5&amp;um=1&amp;itbs=1&amp;tbnid=ZQYRnxx80Om5DM:&amp;tbnh=105&amp;tbnw=140&amp;prev=/images%3Fq%3Dlife%2Bcycle%2Bchlamydia%26um%3D%26hl%3Dpt-PT%26tbs%3Disch:1.....">www2a.cdc.gov/stdtraining/self-study/chlamydia/Clam-SB6.asp&amp;usg=__PeWiMhzs-VIM8o90s4awFZFfJtA=&amp;h=540&amp;w=720&amp;sz=51&amp;hl=pt-PT&amp;start=5&amp;um=1&amp;itbs=1&amp;tbnid=ZQYRnxx80Om5DM:&amp;tbnh=105&amp;tbnw=140&amp;prev=/images%3Fq%3Dlife%2Bcycle%2Bchlamydia%26um%3D%26hl%3Dpt-PT%26tbs%3Disch:1.....</a> | 5  |
| <b>Figura 2:</b> Cromossoma circular de <i>C. trachomatis</i> . Adaptado de Dean <i>et al.</i> 2009.....   | 6  |
| <b>Figura 3:</b> ORFs do plasmídio críptico de <i>C. trachomatis</i> . Adaptado de Clarke, Southampton in <a href="http://www.chlamydiae.com/docs/biology/genome_plasmid.asp">http://www.chlamydiae.com/docs/biology/genome_plasmid.asp</a> .....  | 7  |
| <b>Figura 4:</b> Fragmento do plasmídio críptico. A laranja o <i>Forward primer</i> e a vermelho o <i>Reverse primer</i> , delimitam o fragmento amplificado. Fonte: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X06707.3?report=gbwithparts&amp;log\$=seqview">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X06707.3?report=gbwithparts&amp;log\$=seqview</a> .....   | 47 |
| <b>Figura 5:</b> Fragmento do gene <i>omp1</i> . A laranja o <i>Forward primer</i> e a vermelho o <i>Reverse primer</i> , delimitam o fragmento amplificado. Fonte: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X62921.1">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X62921.1</a> .....  | 48 |
| <b>Figura 6:</b> Fragmento do gene <i>omp1</i> amplificado pela técnica de <i>nested PCR</i> para pesquisa de <i>C. trachomatis</i> . A verde o <i>Forward primer</i> e a azul o <i>Reverse primer</i> da <i>outer PCR</i> , delimitam o fragmento de 1142 amplificado. A laranja o <i>Forward primer</i> e a vermelho o <i>Reverse primer</i> da  |    |

*inner* PCR, delimitam o fragmento de 879 amplificado. Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X62921.1>.....56

**Figura 7:** Fragmento amplificado do gene *ccpB*. A vermelho o *Forward primer* e a laranja o *Reverse primer*, delimitam um fragmento de 390 pb. Fonte: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_001377](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001377).....63

**Figura 8:** Fotografia de gel de agarose a 1,5% para visualização dos produtos amplificados por técnica de PCR para pesquisa de ADN de *N. gonorrhoeae* em que A- Marcador de peso molecular, B- Controlo Positivo, C- Controlo Negativo.....65

**Figura 9:** Fotografia do gel de agarose 1,5% após a electroforese dos produtos amplificados pela técnica de PCR para pesquisa de ADN de *N. gonorrhoeae* e da digestão do fragmento obtido pela enzima de restrição *MspI*. A- Amostra positiva após PCR (banda de 390 pb); B- A mesma amostra após digestão enzimática (duas bandas de 240 e 150 pb); C- Controlo positivo; D- Controlo negativo.....72

**Figura 10:** Fotografia de gel de agarose a 1,5% para visualização dos produtos amplificados por técnica de PCR *multiplex* para identificação de *C. trachomatis*. A- Amostra positiva; B- Marcador de peso molecular, C- Controlo Positivo, D- Controlo Negativo.....73

**Figura 11:** Fotografia de gel de agarose a 1,5% após electroforese dos produtos amplificados por técnica de *inner* PCR. A- Amostras Positivas; B- Marcador de peso Molecular; C- Controlo Positivo.....76

## Índice de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1:</b> Classificação taxonómica da Ordem <i>Chlamydiales</i> segundo a proposta de Everett <i>et al.</i> em 1999.....   | 2  |
| <b>Tabela 2:</b> Resumo de quatro estudos realizados no Reino Unido com vista a determinar a taxa de prevalência para a infecção de <i>C. trachomatis</i> . Adaptado de Wilson <i>et al</i> 2002..... | 28 |
| <b>Tabela 3:</b> Sequências dos primers seleccionados e comprimento dos respectivos fragmentos amplificados, segundo técnica descrita por Jalal <i>et al.</i> (b).....                                | 46 |
| <b>Tabela 4:</b> Volumes e concentrações necessárias para preparar a mistura de reacção da técnica de PCR <i>multiplex</i> .....  | 49 |
| <b>Tabela 5:</b> Condições de amplificação da técnica de PCR <i>multiplex</i> para pesquisa de ADN de <i>C. trachomatis</i> .....   | 50 |
| <b>Tabela 6:</b> Volumes e concentrações necessárias para preparar a mistura de reacção para técnica de PCR <i>multiplex</i> em tempo real para a pesquisa de ADN de <i>C. trachomatis</i> .....      | 53 |
| <b>Tabela 7:</b> Condições de amplificação da técnica de PCR <i>multiplex</i> em tempo real para a pesquisa de ADN de <i>C. trachomatis</i> .....   | 54 |
| <b>Tabela 8:</b> Volumes e concentrações necessárias para preparar a mistura de reacção para a <i>outer</i> PCR para a pesquisa de ADN de <i>C. trachomatis</i> .....                                 | 57 |
| <b>Tabela 9:</b> Condições de amplificação da técnica de <i>outer</i> PCR para a pesquisa de ADN <i>C. trachomatis</i> .....  | 58 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 10:</b> Volumes e concentrações necessárias para preparar a mistura de reacção para a técnica de <i>inner</i> PCR para pesquisa de ADN <i>C. trachomatis</i> .....                             | 59 |
| <b>Tabela 11:</b> Condições de amplificação da técnica de <i>inner</i> PCR para a pesquisa de ADN <i>C. trachomatis</i> .....  | 60 |
| <b>Tabela 12:</b> Algoritmo de interpretação de resultados de <i>inner</i> PCR para pesquisa de ADN de <i>C. trachomatis</i> .....   | 60 |
| <b>Tabela 13:</b> Volumes e concentrações necessárias para preparar a mistura de reacção para a técnica de PCR para pesquisa de ADN de <i>N. gonorrhoeae</i> .....                                       | 64 |
| <b>Tabela 14:</b> Condições de amplificação da técnica de PCR para a pesquisa de ADN de <i>N. gonorrhoeae</i> .....  | 65 |
| <b>Tabela 15:</b> Volumes e concentrações necessárias para preparar a mistura de reacção para técnica de PCR em tempo real para pesquisa de ADN de <i>N. gonorrhoeae</i> .....                           | 67 |
| <b>Tabela 16:</b> Condições de amplificação da técnica de PCR em tempo real para a pesquisa de ADN de <i>N. gonorrhoeae</i> .....  | 68 |
| <b>Tabela 17:</b> Distribuição das grávidas incluídas no estudo, segundo faixa etária, em frequência absoluta e relativa.....  | 70 |
| <b>Tabela 18:</b> Concordância entre as técnicas de PCR <i>multiplex</i> e de PCR <i>multiplex</i> em tempo real.....  | 73 |
| <b>Tabela 19:</b> Comparação da inibição registada ao nível da amplificação nas técnicas de PCR <i>multiplex</i> e de PCR <i>multiplex</i> em tempo real.....  | 75 |
| <b>Tabela 20:</b> Comparação entre os resultados obtidos com a técnica de PCR <i>multiplex</i> (n=40) e a de PCR <i>multiplex</i> em tempo real (n=48), segundo os resultados por <i>nested</i> PCR..... | 76 |

**Tabela 21:** Número de casos, absoluto e em percentual, de infecção por *C. trachomatis* segundo faixa etária.....78

**Tabela 22:** Prevalência dos serovares de *C. trachomatis* segundo faixa etária, em número absoluto e percentagem.....79

## Índice de Gráficos

|  |    |
|--|----|
| <b>Gráfico 1:</b> Idade e sexo dos casos de infecção por <i>N. gonorrhoeae</i> relatados em 2005 nos Estados Unidos da América. Adaptado de Hook & Handsfield, 2008.....   | 34 |
| <b>Gráfico 2:</b> Gráfico em frequência absoluta da utilização de preservativo, segundo faixa etária (anos).....   | 71 |
| <b>Gráfico 3:</b> Emissão de fluorescência pelos produtos amplificados no canal do Controlo Interno pela técnica de PCR <i>multiplex</i> em tempo real para pesquisa de ADN de <i>C. trachomatis</i> .....   | 74 |
| <b>Gráfico 4:</b> Emissão de fluorescência pelos produtos amplificados no canal MOMP pela técnica de PCR <i>multiplex</i> em tempo real para pesquisa de ADN de <i>C. trachomatis</i> . Cor roxa (■)- Controlo positivo; Cor verde (■)- Controlo Negativo; Cor preta (■)- amostra positiva; Cor bege (■)- amostra positiva.....                  | 74 |
| <b>Gráfico 5:</b> Emissão de fluorescência pelos produtos amplificados no canal do plasmídio críptico pela técnica de PCR <i>multiplex</i> em tempo real para pesquisa de ADN de <i>C. trachomatis</i> . Cor roxa (■)- Controlo positivo; Cor verde (■)- Controlo Negativo; Cor preta (■)- amostra positiva; Cor bege (■)- amostra positiva..... | 75 |
| <b>Gráfico 6:</b> Gráfico de caixas e bigodes para a idade em anos e infecção por <i>C. trachomatis</i> .....  | 78 |

## Abstract

The urogenital infection caused by *Chlamydia trachomatis* is the most common sexually transmitted bacterial disease in Europe, both in men and women. It is considered a public health problem due to the high prevalence rate of asymptomatic individuals, to the clinical complications that may cause and to the possibility of vertical transmission.

This study aimed to: i) assess the prevalence of *C. trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in pregnant women at 36 weeks of gestation attending the Obstetrics Department of Amadora Sintra Hospital and in newborns from infected mothers, ii) identify the serovars causing *C. trachomatis* infection, iii) verify the association between the prevalence of *C. trachomatis* infections according to age and iv) evaluate the usefulness of a *multiplex* PCR and real-time *multiplex* PCR for the detection of chlamydial infections.

We tested 1201 first voided urine samples from pregnant women and 18 ocular swabs from newborns whose mothers were infected. Each sample was tested with a *multiplex* PCR and a real-time *multiplex* PCR techniques, whose amplification targets were one fragment from the cryptic plasmid and one from the *omp1* gene. All positive results were confirmed by a *nested* PCR technique and sequenced for the identification of the responsible serovars. All samples were also assessed for the identification of *N. gonorrhoeae* DNA using a PCR and a real-time PCR techniques. In the first one, the amplification target was the *ccpB* gene, which is present in the cryptic plasmid pJDI, and in the second one the target was the *porA* pseudogene. Positive results were confirmed by RFLP.

The prevalence of *C. trachomatis* was 3,7% (45/1201), and of *N. gonorrhoeae* was 0,08% (1/1201). No newborn was found to be infected with either microorganism, from the 18 that were

followed up. The most prevalent serovar was E, representing 31,1% of positive samples, followed by G (15,6%) and D/Da (13,3%). Serovars F, I/Ia and J were identified in 11,1% while serovar K was identified in 4,4% and serovar H in only one sample (2,2%). In general, the best results were obtained with the real-time *multiplex* PCR technique when comparing it with the *multiplex* PCR, since the first detected 100% of infected patients (45/45), while the second detected only 71% (32/45).

**Keywords:** *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, pregnant women, newborn, urine, PCR, real time PCR and cryptic plasmid.



## Abreviaturas

ADN- Ácido Desoxirribonucleico

ARN- Ácido Ribonucleico

*C. trachomatis*- *Chlamydia trachomatis*

CDC- Center for Disease Prevention and Control of Atlanta

DFA- Ensaios de Imunofluorescência Directa, do inglês *Direct Fluorescence Assay*

dNTPs- Dideoxynucleotidos

ECDC- European Centre for Disease Prevention and Control

EIA- Ensaios Imunoenzimáticos, do inglês Enzyme Immunoassay for Antigen

EUA- Estados Unidos da América

FVU- Urina de primeiro jacto, do inglês *First Void Urine*

IGD- Infecção Gonocócica Disseminada

IST- Infecção Sexualmente Transmissível

kb- kilobases

kDa- kiloDaltons

LCR- Reacção em cadeia da ligase, do inglês *Ligase Chain Reaction*

LPS- Lipopolissacárido

m- minuto

MOMP- *Major Outer Membrane Protein*

*N. gonorrhoeae*- *Neisseria gonorrhoeae*

nm- nanómetros

ORF- Grelhas de leitura, do inglês *Open Reading Frame*

OMS- Organização Mundial de Saúde

pb- pares de bases

PC- plasmídio críptico

PCR- Reacção em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polimerase Chain Reaction*

rpm- rotações por minuto

s- segundos

TAAN- Testes de Amplificação de Ácidos Nucleicos

TA- Temperatura Ambiente

VPN- valor preditivo negativo

VPP- valor preditivo positivo

VS - vermed variable segments

°C- Graus centígrados

µl- microlitros

µM- micromolar

## I- Introdução

A infecção por *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) foi identificada pela primeira vez em 1907 por Halberstaedter e von Prowazek ao observarem, por microscopia, inclusões citoplasmáticas num isolado ocular de orangotango que tinha sido inoculado com material de tracoma humano. Pouco tempo depois, inclusões semelhantes foram encontradas em exsudados oculares de recém-nascidos com conjuntivite. As mesmas foram observadas no tracto genital das mães e na uretra dos pais, tendo sido posteriormente associadas a uretrite não gonocócica (Schachter & Stephens, 2008).

Desde então os conhecimentos científicos relacionados com este microrganismo não têm cessado de evoluir, tanto no que respeita à sua biologia, como à sua epidemiologia e técnicas laboratoriais de diagnóstico.

### 1- Género *Chlamydia*

Até 1999, a classificação taxonómica em vigor considerava o Género *Chlamydia* como o único género pertencente à Família *Chlamydiaceae*, o qual era dividido em 4 espécies: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* e *Chlamydia pecorum* (Schachter & Stephens, 2008). Esta classificação baseava-se em critérios morfológicos, bioquímicos, fisiológicos e serológicos (Bush & Everett, 2001).

Em 1999, Everett e colegas propuseram uma série de alterações a esta classificação, com base nos resultados obtidos pela sequenciação de genes dos principais constituintes do envelope bacteriano e de proteínas envolvidas na resposta inflamatória do hospedeiro (Everett *et al.*, 1999).

A Família *Chlamydiaceae* passou a incluir dois géneros: *Chlamydophila* e *Chlamydia*. Ao género *Chlamydia* passaram a pertencer as espécies *C. trachomatis*, *C. suis* e *C. muridarum* (tabela 1) (Everett *et al.*, 1999).

| Ordem               | Família                  | Género               | Espécie                 |
|---------------------|--------------------------|----------------------|-------------------------|
| <i>Chlamydiales</i> | <i>Chlamydiaceae</i>     | <i>Chlamydophila</i> | <i>C. abortus</i>       |
|                     |                          |                      | <i>C. psittaci</i>      |
|                     |                          |                      | <i>C. felis</i>         |
|                     |                          |                      | <i>C. caviae</i>        |
|                     |                          |                      | <i>C. pneumoniae</i>    |
|                     |                          |                      | <i>C. pecorum</i>       |
|                     |                          | <i>Chlamydia</i>     | <i>C. trachomatis</i>   |
|                     |                          |                      | <i>C. suis</i>          |
|                     |                          |                      | <i>C. muridarum</i>     |
|                     | <i>Parachlamydiaceae</i> | <i>Neochlamydia</i>  | <i>N. hartmannellae</i> |
|                     |                          | <i>Parachlamydia</i> | <i>P. acanthamoebae</i> |
|                     | <i>Waddliaceae</i>       | <i>Waddlia</i>       | <i>W. chondrophila</i>  |
|                     | <i>Simkaniaceae</i>      | <i>Simkania</i>      | <i>S. negevensis</i>    |

**Tabela 1:** Classificação taxonómica da Ordem *Chlamydiales* segundo a proposta de Everett *et al.* em 1999

## 2- *Chlamydia trachomatis*

### 2.1- A célula

*C. trachomatis* é uma bactéria de difícil coloração pelas características da sua parede celular, sendo contudo classificada como bactéria de coloração de Gram negativa (Black, 1997). As bactérias desta espécie são imóveis, aeróbias e intracelulares obrigatórias, pela sua incapacidade de sintetizar

ATP, aminoácidos, vitaminas e co-factores, o que as torna incapazes de crescerem em meios comerciais convencionais. Esta característica sempre dificultou o seu isolamento, cultura, identificação e estudo de características fenotípicas (Bush & Everett, 2001). Tudo isto em conjunto com a sua dimensão reduzida valeu-lhes no passado a classificação de protozoários e posteriormente de grandes vírus (Jaschek *et al.*, 1993; Magalhães Santa'Ana, 2000).

O seu único hospedeiro é o homem (Schachter & Stephens, 2008), possuindo capacidade para infectar células do cérvix, da uretra, do recto, da nasofaringe, da conjuntiva e dos gânglios linfáticos (Jaschek *et al.*, 1993).

A célula bacteriana é constituída por uma parede celular bem adaptada ao ciclo de vida e aparentemente desprovida de peptidoglicano (Moulder, 1993; Ghuysen & Goffin, 1999), e por uma membrana exterior que contém as proteínas designadas como *Major Outer Membrane Protein* (MOMP). Estas são proteínas transmembranares que representam 30% do peso da bactéria e 60% do peso da membrana, embora o peso varie ligeiramente de acordo com o serovar (38-43 kDa). Estas proteínas desempenham um papel importante como porinas na manutenção da integridade da parede celular, na diferenciação do serovar e na capacidade imunológica da bactéria (Schachter & Stephens, 2008).

## 2.2- Ciclo de vida

As bactérias deste género apresentam um ciclo de vida bifásico em que alternam entre duas formas distintas, uma intracelular (corpo reticular) e outra extracelular (corpo elementar) (Albrecht *et al.*, 2010).

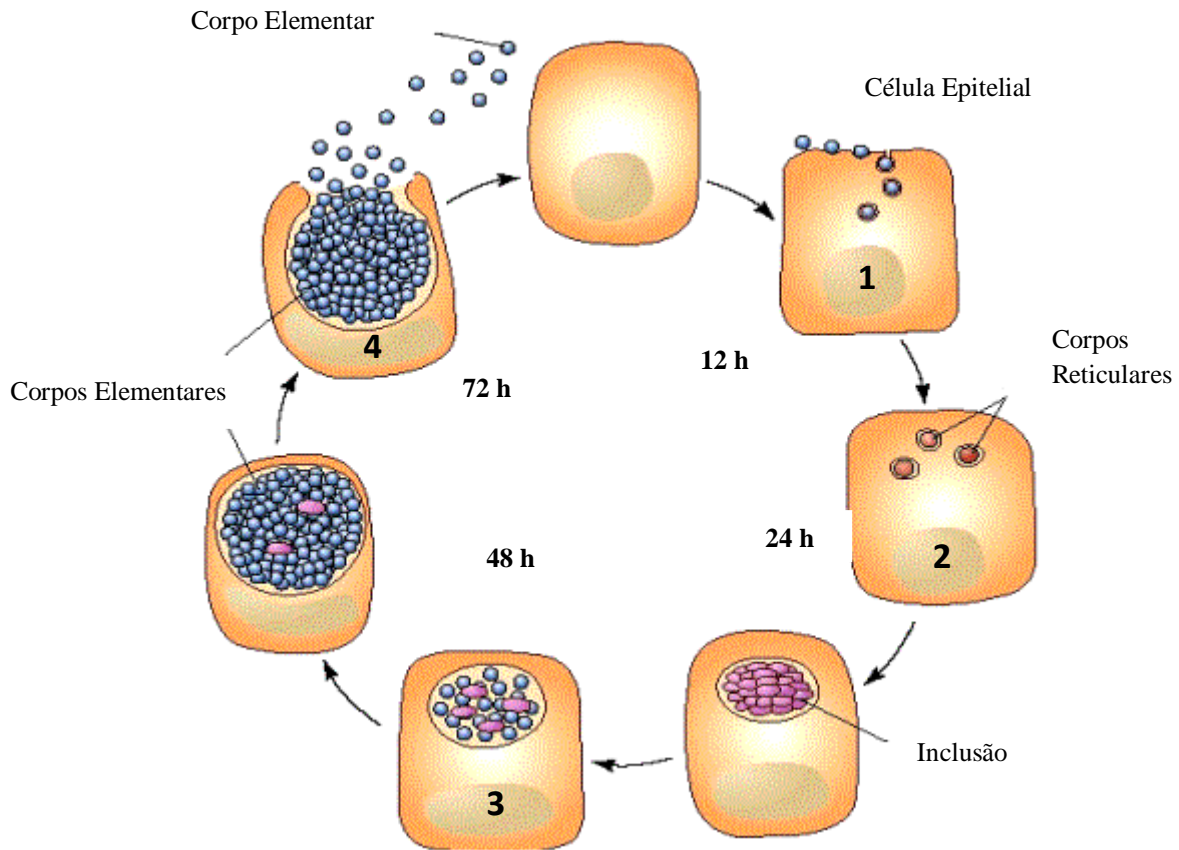
O corpo elementar, a forma de resistência e de propagação, é metabolicamente inactivo. Possui um invólucro rígido constituído por uma membrana citoplasmática e uma membrana exterior semelhante à das bactérias de coloração de Gram negativas. Este invólucro confere-lhe uma forma esférica com cerca de 200-400 nm, tem um aspecto compacto e os ribossomas raramente são visíveis (Magalhães Santa'Ana, 2000).

O corpo reticular é metabolicamente activo, tem um tamanho superior ao do corpo elementar, e não possui capacidade infectante. De forma e tamanho variáveis, este oscila entre os 600 e os 1500 nm, o citoplasma apresenta um aspecto reticular com muitos ribossomas dispersos e o invólucro é semelhante ao dos corpos elementares, sendo contudo mais permeável e sensível à digestão enzimática (Magalhães Santa'Ana, 2000).

O ciclo de vida inicia-se com a ligação dos corpos elementares à superfície das células susceptíveis, com consequente endocitose. Esta penetração no interior da célula hospedeira dá-se por um processo ainda pouco conhecido, mas que se julga ser activado pela bactéria. Uma vez no interior da célula, o corpo elementar sofre alterações que implicam a perda da capacidade infectante e, cerca de 8 horas depois, passa para a sua forma metabolicamente activa, o corpo reticular. Nesta fase, a bactéria começa a produzir os seus próprios ácidos nucleicos e proteínas, e os corpos reticulares multiplicam-se, sucessivamente, por divisão binária, dentro do vacúolo citoplasmático. Todo o ciclo intracelular se passa dentro deste vacúolo, que rompe entre as 48 e as 72 horas após a sua formação, libertando os corpos elementares por exocitose ou por lise da célula hospedeira (Schachter & Stephens, 2008; Albrecht *et al.*, 2010).

A bactéria depende da célula hospedeira para a obtenção de ATP e alguns aminoácidos necessários à síntese de proteínas estruturais, pelo que a privação destes impede a conclusão do seu ciclo de vida ou resulta na formação de corpos elementares não infectantes (Magalhães Santa'Ana, 2000).

A figura 1 ilustra as principais etapas do ciclo de vida das bactérias da espécie *C. trachomatis*.



**Figura 1:** Ciclo de vida de *C. trachomatis*. 1- Adesão e entrada dos corpos elementares na célula epitelial susceptível; 2- Corpos reticulares dentro dos vacúolos; 3- Transformação dos corpos elementares em corpos reticulares; 4- liberação dos corpos elementares. Adaptado de: [www2a.cdc.gov/stdtraining/self-study/chlamydia/Clam-SB6.asp&usg=\\_\\_PeWiMhzs-VIM8o90s4awFZFfJtA=&h=540&w=720&sz=51&hl=pt-PT&start=5&um=1&itbs=1&tbid=ZQYRnxx80Om5DM:&tbnh=105&tbnw=140&prev=/images%3Fq%3Dlife%2Bcycle%2Bchlamydia%26um%3D%26hl%3Dpt-PT%26tbs%3Disch:1](http://www2a.cdc.gov/stdtraining/self-study/chlamydia/Clam-SB6.asp&usg=__PeWiMhzs-VIM8o90s4awFZFfJtA=&h=540&w=720&sz=51&hl=pt-PT&start=5&um=1&itbs=1&tbid=ZQYRnxx80Om5DM:&tbnh=105&tbnw=140&prev=/images%3Fq%3Dlife%2Bcycle%2Bchlamydia%26um%3D%26hl%3Dpt-PT%26tbs%3Disch:1)

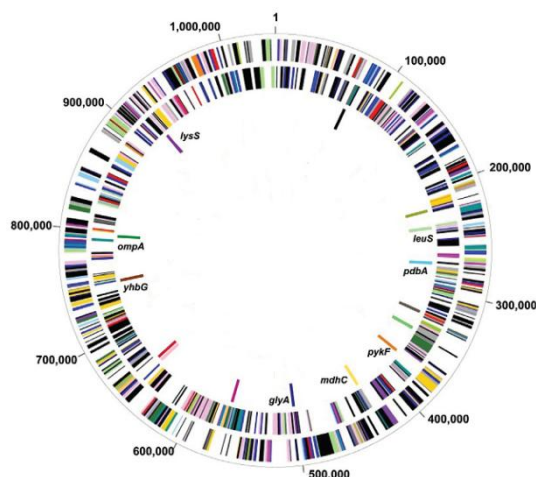
## 2.3- Genoma

O genoma de *C. trachomatis* é constituído por um único cromossoma circular (figura 2), que apresenta uma homologia de cerca de 96% entre os 20 serovares descritos (Golden *et al.*, 2003;

Quint *et al.*, 2007). Este género possui um dos mais pequenos genomas bacterianos conhecidos, com cerca de 1.0-1.2 milhões de pares de base, organizados em 875 ORFs (*Open Reading Frame*), e com um conteúdo de cerca de 43% de G+C (Schachter & Stephens, 2008).

A análise do genoma permitiu verificar a existência de um elevado número de genes que codificam proteínas de transporte, entre elas as responsáveis pelo transporte de ATP e de nucleótidos, tendo sido sequenciados genes codificantes de proteínas envolvidas no ciclo de Krebs, na síntese e degradação de glicogénio e na respiração aeróbia (Hatch citado por Tjaden *et al.*, 1999).

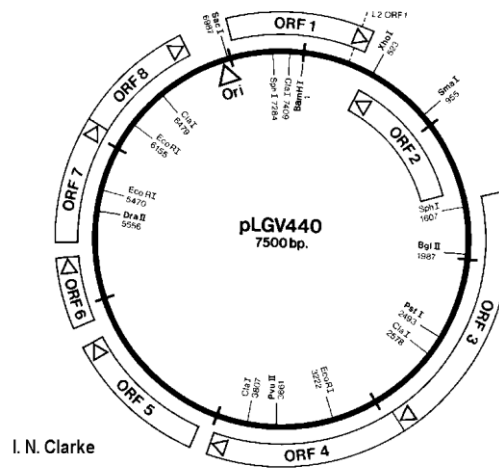
O gene *omp1*, que codifica para as MOMP, está situado no cromossoma circular e consiste em cinco regiões altamente conservadas entre os serovares alternadas por quatro regiões variáveis de cerca de 40 a 90 pb (VS1-VS4) (Yuan *et al.*, 1989; Dean, 1999; Stevens *et al.*, 2004). Segundo Yuan *et al.* a diversidade existente na VS1 e VS2 é suficiente para distinguir todos os serovares (Yuan *et al.*, 1989).



**Figura 2:** Cromossoma circular de *C. trachomatis*. Adaptado de Dean *et al.*, 2009

O plasmídio críptico foi descrito pela primeira vez por Lovett *et al.* em 1980 e sequenciado por Striprakash *et al.*, em 1987. *C. trachomatis* possui 7-10 cópias deste plasmídio, bem conservado em tamanho e sequência, com cerca de 7500 pb organizados em 8 ORFs (figura 3).





**Figura 3:** ORFs do plasmídeo críptico de *C. trachomatis*

Adaptado de Clarke, Southampton in [http://www.chlamydiae.com/docs/biology/genome\\_plasmid.asp](http://www.chlamydiae.com/docs/biology/genome_plasmid.asp)

Em 1997, Farencena *et al.* descreveram uma estirpe de *C. trachomatis* serovar B sem plasmídeo críptico num exsudado uretral de um paciente de uma clínica de infeções sexualmente transmissíveis em Itália (Farencena *et al.*, 1997). Anteriormente, tinha sido descrito um caso de linfogranuloma venéreo (LGV), causado por uma estirpe sem plasmídeo, pertencente ao serovar L2 (Peterson *et al.*, 1990). Tanto num estudo como no outro as bactérias não apresentavam diferenças significativas de crescimento e desenvolvimento. Em 1998, Stothard *et al.*, isolaram, nos EUA, num exsudado uretral mais uma estirpe de *C. trachomatis* sem plasmídeo críptico, que pertencia ao serovar E (Stothard *et al.*, 1998). Apesar da função deste plasmídeo não ser totalmente conhecida, fica claro que não é indispensável ao ciclo de vida da bactéria, mas provavelmente confere algum tipo de vantagem evolutiva, pensa-se que possa ter um papel importante no ciclo de vida da bactéria, facilitando a entrada na célula, a sua replicação no interior ou mesmo na expulsão dos corpos elementares, há também a teoria de que este possa interferir no controlo da resposta imunitária do hospedeiro (Farencena *et al.*, 1997).

Cristina Isabel dos Santos Paixão Lobato

Pela sua existência em multi-cópia, o plasmídio críptico tem uma grande utilidade na prática laboratorial, já que aumenta a sensibilidade das técnicas de diagnóstico que o utilizam como alvo (Chernesky, 2005).

Em 2006, na Suécia, foi identificada uma nova variante do serovar E de *C. trachomatis* com uma deleção de cerca de 377 pb no plasmídio críptico (Jurstrand *et al.*, 2010; Herrmann *et al.*, 2008) entre os pares 608 e 985, que corresponde à ORF 1 (Reischl *et al.*, 2009). Esta nova variante não tinha sido ainda detectada porque a sequência alvo da maior parte dos testes de biologia molecular utilizados na altura se situava nesta zona, produzindo falsos negativos. A introdução de novas técnicas de diagnóstico molecular que utilizavam como alvo outras regiões do genoma bacteriano teve como consequência um aumento da prevalência da infecção por *C. trachomatis* associada ao serovar E, de cerca de 47% em 1999-2000 para cerca de 69% em 2006 (Jurstrand *et al.*, 2010).

## 2.4- Serovares de *C. trachomatis*

As bactérias pertencentes à espécie *C. trachomatis* estão divididas em 20 serovares, A, B, Ba, C, D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J, K, L1, L2, L2a, L2b e L3 (Quint *et al.*, 2007), sendo esta classificação baseada em diferenças na sequência do gene *omp1*. Esta classificação é importante em estudos epidemiológicos e para futuros programas de vacinação (Quint *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2006).

Os serovares podem ser agrupados em três grandes grupos consoante o tipo de manifestações clínicas a que geralmente estão associados: o grupo do tracoma, que inclui os serovares A, B, Ba e C, o grupo do LGV a que pertencem os serovares L1, L2, L2a, L2b e L3 e o grupo das infecções oculogenitais onde se incluem todos os restantes (Chernesky, 2005).

Em 2007, Quint e colegas ao estudarem um grupo de mulheres jovens da Costa Rica, obtiveram como serovar mais prevalente o E com 31%, seguido dos F e D, ambos com 21% e do I com 15% (Quint & Porras *et al.*, 2007). Num outro estudo, também realizado por Quint *et al.* no mesmo ano, em que estudaram exsudados cervicais de utentes de consultas de ginecologia do Uganda e da Holanda, os serovares mais prevalentes foram, no Uganda, o G/Ga com 45%, o E com 21%, o K com 13% e o F com 8%. Na Holanda os resultados obtidos na distribuição dos serovares foram distintos, surgindo primeiro o E associado a 38% dos casos de infecção por *C. trachomatis*, depois o F com 23%, o G/Ga com 11% e por último o D/Da com 7% (Quint *et al.*, 2007).

Em 2008 na Austrália, Bandea *et al.* efectuaram a fenotipagem de 45 amostras em que tinham identificado previamente ADN de *C. trachomatis* e obtiveram como serovar mais prevalente o E (48.9%), seguido do F (22,2%), do J/Ja (11.1%), do D/Da (8,9%), do G (6,7%) e por último o K (2,2%) (Bandeia *et al.*, 2008).

No Japão, Takahashi *et al.* (2007) identificaram oito serovares diferentes, sendo que o mais prevalente foi o E, seguido do D, G e F (Takahashi *et al.*, 2007).

Yamazaki *et al.* (2005) efectuaram um estudo de comparação de serovares de *C. trachomatis* entre prostitutas e não prostitutas na Tailândia e não prostitutas no Japão. Não foram detectadas diferenças significativas entre os dois grupos tailandeses, tendo os serovares mais frequentemente identificados sido, o F (35,2%), o E (18,3) e o K (15,5). No grupo de não prostitutas do Japão, os investigadores identificaram como serovares mais prevalentes os D, F, E e G (Yamasaki *et al.*, 2005), o que está de acordo com os dados obtidos por Ikehata *et al.*, em 2000 (Ikehata *et al.*, 2000). Também Singh *et al.*, em 2003, na Índia, chegaram a conclusões idênticas, no qual os serovares mais frequentes foram os D (48%), E (34%) e F (12%) (Singh *et al.*, 2003).

Por outro lado, este mesmo tipo de distribuição de serovares de *C. trachomatis* (D, E e F) foi encontrado num estudo realizado nos EUA, sendo de salientar uma taxa invulgarmente alta do serovar Ia (Millman *et al.*, 2004), enquanto que num estudo alemão, Näher e colegas chegaram à conclusão de que o serovar E era responsável por 35,7% das infecções por *C. trachomatis*, seguido do D (28,6%) e do F (26,8%) (Näher & Petzoldt, 1991).

### 3- Infecção por *C. trachomatis*

As manifestações clínicas da infecção por *C. trachomatis* podem ser divididas em três grandes grupos: tracoma, LGV e infecções urogenitais e oculares, e associados, como anteriormente referido, a serovares específicos (Chernesky, 2005; Jalal *et al.*, 2006 b).

#### 3.1- Infecção associada aos serovares A-C

A infecção pelos serovares A-C de *C. trachomatis* está na origem de problemas oculares como conjuntivite e tracoma (Stevens *et al.*, 2004).

Os serovares A e C nunca foram isoladas no tracto genital, tendo sido encontrados apenas em casos de tracoma, enquanto o serovar B, frequentemente isolado em zonas hiper-endémicas para esta infecção, já foi encontrado no tracto genital (Farencena *et al.*, 1997; Quint *et al.*, 2007, Zheng *et al.*, 2007).

Em zonas endémicas a transmissão mais comum é o contacto directo entre crianças. Em países hiper-endémicos as próprias moscas e mosquitos funcionam como vectores mecânicos ao

transportarem gotículas oculares infectadas (Schachter & Stephens, 2008). Segundo Stevens *et al.* mãos, roupas e insectos voadores que tenham contacto com produtos biológicos infectados são os principais meios de disseminação destes serovares nestas regiões (Stevens *et al.*, 2004).

A conjuntivite de inclusão no adulto pode evoluir para tracoma, a segunda causa de cegueira no mundo e a causa mais comum de cegueira reversível em algumas zonas do Mediterrâneo e do Médio Oriente (Chernesky, 2005). Resulta da inflamação persistente e cicatrização da conjuntiva, que mais tarde causa retracção da pálpebra, danificando a córnea e conduzindo à cegueira. O estado imunológico do hospedeiro é determinante nesta evolução. Reinfecções, co-infecções, exposições anteriores e qualquer tipo de sensibilidade aumentada, a nível do sistema imunológico, diminuem drasticamente a capacidade da doença ser auto-limitada (Schachter & Stephens, 2008).

### 3.2- Infecções e sequelas associadas aos serovares D-K

Os serovares D-K estão sobretudo associados a infecções urogenitais. Estes e o serovar B para além de transmitidos sexualmente são também passíveis de serem transmitidos verticalmente. A transmissão por via sexual dá-se pelo contacto directo entre a mucosa (células epiteliais da zona vaginal, cervical, uretral ou rectal) e a zona infectada (Zheng, 2006; Albrecht, 2010).

*C. trachomatis* é a principal causa de uretrite não gonocócica (50-60% dos casos) em ambos os sexos, podendo causar sintomas como disúria e secreção uretral purulenta (Radcliffe, 2001). Contudo, é assintomática em grande parte dos casos (50-75% nas mulheres e 25-50% no homens) (CDC, 2006).

No homem pode causar epididimite, orquite e proctite (Stamm, 2008). Têm um período de incubação de 1-2 semanas, mas pode persistir assintomática durante anos (Radcliffe, 2001).

Na mulher, os sintomas e manifestações clínicas são cervicite, salpingite, hemorragias intermenstruais, corrimento vaginal purulento e dor abdominal (Radcliffe, 2001). Caso não seja tratada a tempo pode evoluir para dor pélvica crónica, doença inflamatória pélvica crónica e recorrente, gravidez ectópica e infertilidade por fibrose das Trompas de Falópio (Quinn *et al.*, 1996; Chernesky, 2005; Quint *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2008; ECDC, 2009). Na grávida pode causar aborto, ruptura prematura das membranas e parto precoce (Stamm, 2008).

O Síndrome de Fitz-Hugh-Curtis, ou Peri-hepatite, e o Síndrome de Reiter, ou Artrite Reactiva Adquirida Sexualmente (ARAS), são complicações bastante raras causadas pela infecção por *C. trachomatis*. A peri-hepatite surge após ou durante o processo de salpingite e deve colocar-se a sua suspeita diagnóstica em mulheres jovens sexualmente activas com dor no quadrante superior direito, com febre, náuseas e vómitos. O Síndrome de Reiter manifesta-se de forma assimétrica e é caracterizado por uretrite, artrite e conjuntivite, e pode ou não desenvolver-se lesões mucocutâneas dolorosas. Deve suspeitar-se de ARAS em casos de artrite em pacientes jovens sexualmente activos (Stamm, 2008; Radcliffe, 2001).

No recém-nascido (RN) a infecção dá-se pelo contacto com o endocervix infectado da mãe durante o parto e pode originar infecção ocular e/ou pneumonia (Black, 1997). Desde a introdução da terapêutica profiláctica por nitrato de prata (só é eficaz na conjuntivite por *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*)) que *C. trachomatis* é a principal responsável por conjuntivite no recém-nascido (Kakar *et al.*, 2010). O mais comum é a conjuntivite desenvolver-se 5-12 dias após o nascimento e a pneumonia 1-3 meses (Black, 1997; CDC, 2006). O rastreio pré-natal é muito eficaz na prevenção da transmissão vertical (ECDC, 2001). Segundo dados da OMS, estima-se que anualmente cerca de

4000 RN fiquem cegos como complicação de uma conjuntivite que lhes é transmitida durante a passagem através do canal do parto por uma mãe infectada não tratada (OMS, 2007).

Alguns estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de relacionar estes serovares de *C. trachomatis* com sintomatologias mais específicas. Batteiger *et al.* associaram os serovares F e G com uma menor quantidade de polimorfonucleares nas zonas infectadas em comparação com outros serovares associados a infecções urogenitais nos homens, enquanto que nas mulheres não conseguiram identificar qualquer relação (Batteiger *et al.*, 1987). No entanto, os resultados obtidos por Workowsky e colegas, em 1994, foram diferentes. Utilizaram um grupo de 155 mulheres, das quais 99 apresentavam infecção do tracto urogenital inferior e 56 tinham diagnóstico de doença inflamatória pélvica. O serovar F foi associado a respostas inflamatórias mais fracas, e também foi considerado menos frequente em infecções rectais, quando comparado com os outros serovares identificados no grupo. No entanto, em relação à doença inflamatória pélvica não foi identificada nenhuma relação com um serovar específico (Workowsky *et al.*, 1994). Dean *et al.* identificaram uma associação entre o serovar E e infecções assintomáticas, e detectaram uma mutação no serovar F que poderá eventualmente estar relacionado com o desenvolvimento de doença inflamatória pélvica (Dean *et al.*, 1995).

### 3.3- Infecção associada aos serovares L

Os serovares L1, L2, L2a, L2b e L3 são os responsáveis pelo LGV (Chernesky, 2005) ou *Doença de Durand-Nicolas-Favre*, uma doença invasiva e sistémica, resultante do tropismo destes serovares pelo tecido linfático (CDC, 2006; Kakar *et al.*, 2010). O serovar L2b é o mais frequentemente encontrado (Castro *et al.*, 2010). Esta infecção é considerada uma doença rara em países

industrializados, mas endémica em alguns países tropicais (Castro *et al.*, 2010). No entanto, nos últimos anos tem sido detectado, nos países industrializados, um aumento no número de casos de LGV associado a proctite causada pelo serovar L2b. Este tipo de LGV tem-se verificado, essencialmente, entre homens homossexuais infectados com o vírus da imunodeficiência humana adquirida (VIH) ou da hepatite C que praticam sexo anal passivo, na sua maioria relatando actividade sexual com vários parceiros e actividades sexuais de risco, e em mulheres que praticam sexo anal (CDC, 2002; Macdonald *et al.*, 2005; French *et al.*, 2005; Chernesky, 2005; Kropp & Wong, 2005; Halioua *et al.*, 2006; Waalboer *et al.*, 2006; Stark *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2010).

A história natural desta infecção evolui em três estádios: primário no local da inoculação, secundário quando já envolve os gânglios linfáticos e por vezes o ânus e o recto e o terciário já com sequelas mais graves. A lesão primária surge aproximadamente 30 dias após a infecção, e consiste numa pápula geralmente indolor no local da inoculação que pode ulcerar rapidamente. Esta lesão inicial pode não ocorrer ou passar despercebida. O estágio secundário é caracterizado pela formação de adenopatias dos gânglios inguinais ou anorrectais, bem como, hemorragias, febre, dor inguinal e outros sintomas sistémicos. A grande maioria dos doentes recupera nesta fase e sem sequelas. Só uma pequena percentagem dos doentes evolui para o terceiro estágio, que se caracteriza por úlceras genitais, elefantíase genital, fístulas e obstrução intestinal (Stamm, 2008).

### 3.4- Tratamento

O tratamento recomendado pelo *Center for Disease Control and Prevention of Atlanta* (CDC) e pelo ECDC consiste em azitromicina oral dose única ou doxiciclina, durante sete dias e deve incluir todos os parceiros sexuais do indivíduo infectado. A abstinência sexual é recomendada no mínimo



nos sete dias que sucedem o fim da terapêutica, para prevenir o risco de transmissão. No caso de LGV os antibióticos recomendados são os mesmos, mas o tratamento deve ter uma duração de 21 dias (CDC, 2006; Radcliffe, 2001).

Pacientes infectados com *C. trachomatis* devem ser testados para outras infecções sexualmente transmissíveis (IST). O antibiótico a utilizar e a duração da terapêutica é a mesma, independentemente de co-infecções por *N. gonorrhoeae* ou VIH (Radcliffe, 2001; CDC, 2006).

No caso de mulheres grávidas é recomendada eritromicina ou amoxicilina durante sete dias ou azitromicina sempre que haja suspeita de não cumprimento da terapêutica (Radcliffe, 2001).

A repetição do teste após tratamento é aconselhada em mulheres grávidas, em caso de persistência de sintomas, quando se suspeita da não adesão do doente à terapêutica, na possibilidade de uma reinfecção e após terapêutica com eritromicina visto que há uma maior hipótese de fracasso do tratamento (Radcliffe, 2001).

No caso da conjuntivite e da pneumonia em crianças e RN, ou em infecções urogenitais em crianças até aos 8 anos o antibiótico recomendado é a eritromicina. Crianças com mais de 8 anos devem seguir o mesmo esquema terapêutico de azitromicina aplicado aos adultos. Um exsudado ocular de RN positivo para *C. trachomatis* deve também ser testado para *N. gonorrhoeae*, e o tratamento deve incluir a mãe e os respectivos parceiros sexuais (Radcliffe, 2001).

#### 4- Diagnóstico Laboratorial da Infecção por *C. trachomatis*

As infecções do aparelho genital por *C. trachomatis* são consideradas as principais causas de infecções sexualmente transmissíveis na Europa e nos Estados Unidos, onde se registam cerca de 3 a 4 milhões de casos por ano (OMS, 2007).

Cristina Isabel dos Santos Paixão Lobato

As taxas de transmissão, superiores aos de *N. gonorrhoeae* e *Treponema pallidum*, a sua ampla distribuição geográfica e as inúmeras complicações e sequelas que podem decorrer de uma infecção por *C. trachomatis* são preocupantes, justificando o uso de métodos diagnósticos sensíveis e rápidos para a sua identificação. A escolha do método deve considerar factores como a prevalência da infecção na população, proporção custo/benefício, infra-estruturas laboratoriais necessárias e tempo disponível para a obtenção de resultados (Oliveira *et al.*, 2008).

#### 4.1- Tipo de amostras, colheita e transporte

Um diagnóstico microbiológico correcto exige sempre uma colheita e transporte da amostra adequados ao microrganismo em questão e à metodologia laboratorial a que se destina, o que se aplica também à *C. trachomatis*, microrganismo que, por ser intracelular, só pode ser isolado em culturas celulares (Chernesky & Mahony, 1999).

Para o diagnóstico de infecção por *C. trachomatis* podem utilizar-se exsudados endocervicais, uretrais, rectais, oculares, nasofaríngeos e urina para a sua identificação, assim como sangue para a pesquisa de anticorpos específicos (CDC, 2002).

Os exsudados endocervicais devem ser sempre colhidos por um profissional de saúde. Para efectuar a colheita, a zaragatoa deve ser introduzida no canal endocervical 1 a 2 centímetros em profundidade e rodada durante 15 a 30 segundos, de modo a colher células, principalmente, quando se destinam a ser analisadas por técnicas que não de biologia molecular (CDC, 2002).

No que respeita aos exsudados oculares devem ser colhidos utilizando duas zaragatoas estéreis de algodão, uma para cada olho. Cada zaragatoa deve ser passada na mucosa do olho evitando o

contacto com as pestanas e enviado para o laboratório em meio de transporte adequado (Chernesky, 2005; Kakar *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, a possibilidade de utilizar amostras colhidas pelo próprio, como a urina, permitiu uma diminuição nos custos associados aos recursos humanos e às infra-estruturas, e tornou o rastreio mais aceitável no caso de doentes assintomáticos (ECDC, 2009). A correcta colheita deste tipo de amostras implica que o indivíduo seja instruído a colher 20 a 30 ml de urina de primeiro jacto (FVU- First Void Urine) para um contentor estéril, após uma abstinência urinária de pelo menos uma hora, para aumentar o número de células presentes na amostra (Carder *et al.*, 2006). As amostras não processadas no dia da colheita devem ser armazenadas a uma temperatura entre os 2 e os 8°C durante um prazo máximo de 5 dias.

## 4.2- Cultura Celular

A utilização de culturas celulares para o diagnóstico de *C. trachomatis* surgiu na década de 60. A cultura celular de *C. trachomatis* consiste em inocular uma monocamada de células susceptíveis (células McCoy tratadas com cicloheximida) com a amostra a pesquisar. Após 48-72h a 37°C, as células, se infectadas, apresentam inclusões citoplasmáticas típicas que contêm corpos elementares e corpos reticulares. Estas inclusões são depois detectadas e identificadas pela adição de anticorpos monoclonais anti-MOMP conjugados com fluoresceína (CDC, 2002).

Até há poucos anos, por apresentar alta especificidade (perto dos 100%), a cultura celular era considerada o teste de referência para o diagnóstico da infecção por *C. trachomatis*. Contudo, devido à sua baixa sensibilidade (40-85%) (Quinn *et al.*, 1996; Chernesky & Mahony, 1999;

ECDC, 2009) tem vindo a ser testada em paralelo com técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT), e progressivamente substituída por estas (Radcliffe, 2001; Oliveira *et al.*, 2008).

Como referido acima, a sensibilidade da cultura celular é de cerca de 40-85%, mas apenas quando utilizada em exsudados endocervicais e uretrais em condições ideais (colhidos por profissionais de saúde e processados em laboratórios especializados). Uma colheita mal efectuada, armazenamento e/ou transporte, pode diminuir a sensibilidade em cerca de 70 a 80% (ECDC, 2009; Chernesky & Mahony, 1999).

As grandes vantagens desta técnica são a sua elevada especificidade, o que a torna a única técnica aceite legalmente em casos de suspeita de abuso sexual (CDC, 2002; Radcliffe 2001), e o facto de ser o único meio de diagnóstico que permite manter os microrganismos viáveis para estudos posteriores, como para execução de testes de sensibilidade a antibióticos (CDC, 2002).

Em suma, as principais desvantagens do diagnóstico laboratorial da infecção por *C. trachomatis* por cultura celular prendem-se com a sua baixa sensibilidade, a demora na obtenção de resultados, a sua difícil padronização, o ser uma técnica complexa e trabalhosa que requer microrganismos viáveis, a necessidade de um transporte muito rigoroso e os seus custos serem relativamente elevados (CDC, 2002; Oliveira *et al.*, 2008). A cultura celular também não é apropriada para pesquisa em amostras de urina nem em exsudados rectais (Radcliffe, 2001).

#### 4.3- Pesquisa de antígenos de *C. trachomatis*

A pesquisa dos antígenos de superfície de *C. trachomatis* é efectuada com recurso a ensaios de imunofluorescência ou imunoenzimáticos (Chernesky & Mahony, 1999).

A imunofluorescência directa (IFD) surgiu na década de 80 (Chernesky & Mahony, 1999) e actualmente é aplicável a exsudados endocervicais e oculares. Para a sua execução utilizam-se anticorpos monoclonais anti-lipopolissacárido ou anti-MOMP marcados com fluoresceína (Oliveira *et al.*, 2008; Dean *et al.*, 2009). A sua sensibilidade, está na ordem dos 75-85%, dependendo do número de corpos elementares presentes na amostra. A sua especificidade é de 98-99% quando comparada com a cultura celular (Dean *et al.*, 2009; Schachter & Stamm, 1999).

Esta técnica apresenta várias limitações: requer um grande número de microrganismos viáveis (Jaschek, 1993), é muito dispendiosa (pela utilização de anticorpos monoclonais) e trabalhosa, o que dificulta a sua aplicação num grande número de amostras, apresenta algumas reacções cruzadas com outras espécies do Género (quando se utiliza os anticorpos anti-LPS), requer equipamento sofisticado e profissionais experientes para a sua execução (Radcliffe, 2001; CDC, 2002).

Os ensaios imunoenzimáticos detectam o antígeno LPS através da utilização de anticorpos mono ou policlonais marcados com uma enzima, apresentando a desvantagem de, por vezes, produzir reacções cruzadas com outras espécies do Género *Chlamydia* (CDC, 2002).

Estes ensaios são mais rápidos e baratos do que a cultura celular e as técnicas de IFD. Contudo, têm uma sensibilidade relativamente baixa (20-85%) (Jaschek *et al.*, 1993; Radcliffe, 2001).

#### 4.4- Pesquisa de Anticorpos Anti- *C. trachomatis*

Actualmente, as técnicas mais utilizadas para a pesquisa de anticorpos anti-*C. trachomatis* são os ensaios imunoenzimáticos indirectos, de imunofluorescência indirecta e a microimunofluorescência (Chernesky, 2001).

O diagnóstico com base em títulos de anticorpos específicos requer algumas precauções, uma vez que os anticorpos anti-*C. trachomatis* são bastante persistentes e os seus títulos se mantêm elevados após o fim da infecção. Assim, um resultado positivo não significa necessariamente uma infecção activa. Considera-se que o doente tem uma infecção activa quando existe o aumento do título em relação a uma titulação anterior de duas vezes ou mais (Chernesky, 2005).

No RN a sua utilidade limita-se aos casos em que há suspeita de pneumonia por *C. trachomatis* (IGM superior a 1:32), uma vez que no caso de conjuntivite, por ser uma infecção local, os anticorpos IgM raramente estão presentes, e os da classe IgG são, na sua maioria, provenientes da mãe (Chernesky, 2005).

A pesquisa de anticorpos pode ser uma técnica importante no diagnóstico do LGV, uma vez que como doença sistémica que é produz uma grande resposta do sistema imunitário e consequentemente títulos elevados de anticorpos anti- *C. trachomatis* (Black, 1997).

As técnicas de imunofluorescência são trabalhosas, difíceis de aplicar a um grande número de amostras e muito dependentes da experiência do profissional que as executa, contudo, permitem detectar anticorpos género e espécie específicos (Chernesky, 2005). As imunoenzimáticas, apesar de aplicáveis a grandes volumes de trabalho, apresentam sensibilidades inferiores (50-80%) (Black, 1997; Jones *et al.*, 2003, citado por Magalhães, 2010).

## 4.5- Pesquisa de Ácidos Nucleicos

### 4.5.1- Hibridação de Ácidos Nucleicos

Duas técnicas de hibridação de ácidos nucleicos (Gen-Probe PACE<sup>®</sup> 2 e o Digene Hybrid Capture<sup>®</sup> II) foram aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o diagnóstico laboratorial de

*C. trachomatis*. Ambos permitem a detecção simultânea de *N. gonorrhoeae*. Uma grande vantagem destes testes é o facto de o armazenamento das amostras poder ser efectuado até sete dias sem refrigeração, sem que haja interferência nos resultados (CDC, 2002).

Este tipo de técnicas apresenta uma sensibilidade de 70-85% (Radcliffe, 2001) e as vantagens de serem rápidas, automatizáveis e aplicáveis a um grande número de amostras, para além de permitir efectuar o diagnóstico de infecção gonocócica em simultâneo. Contudo, apenas podem ser utilizadas para o estudo de amostras invasivas (ECDC, 2009).

#### 4.5.2- Técnicas de Amplificação de Ácidos Nucleicos

Na década de 90 surgiram as primeiras técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT), como a Reacção em Cadeia da Polimerização (PCR- *Polymerase Chain Reaction*), Reacção em Cadeia da Ligase (LCR- *Ligase Chain Reaction*), *Q-β Replicase Amplified Hybridization* (QβRAH), “*Transcription Mediated Amplification*” (TMA), e outros “*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*” (NASBA) (Chernesky & Mahony, 1999). Desde então várias NAAT têm sido desenhadas para a pesquisa de ADN de *C. trachomatis*, tendo como alvo genes do plasmídeo críptico, das MOMP, de proteínas ricas em cisteína ou da subunidade 16S do ARN (Everett *et al.*, 1999).

As técnicas tendo como alvo de amplificação o gene do plasmídeo críptico ganharam importância porque o facto de cada corpo elementar de *C. trachomatis* possuir cerca de 7-10 cópias desse gene aumenta bastante a sensibilidade da técnica. Segundo um estudo publicado em 2006 a sensibilidade de uma técnica de PCR dirigida ao plasmídeo críptico é capaz de detectar quantidades de ADN até

dez vezes menores do que uma técnica de PCR cujo alvo para amplificação seja o gene *omp1* (Jalal *et al.*, 2006 a, b).

Várias NAAT estão, actualmente, autorizados pela FDA para o diagnóstico da infecção por *C. trachomatis* em exsudados endocervicais, exsudados uretrais e amostras de urina. Outros tipos de produtos biológicos (exsudados vaginais e oculares), apesar de testados também com óptimos resultados, ainda não reúnem consenso. A utilização destas técnicas em exsudados orofaríngeos e rectais é desaconselhada (CDC, 2002).

Catry *et al.*, estudaram um grupo de 327 mulheres e 112 homens que procuraram uma Clínica de Doenças Sexualmente Transmissíveis e de Planeamento Familiar de Lisboa entre Março de 1993 e Março de 1994. Foram colhidos dois exsudados endocervicais às mulheres, um para técnica de PCR e outro para cultura celular, e uma amostra de urina para técnica de PCR e uma zaragatoa uretral para cultura celular aos homens. Os autores obtiveram uma sensibilidade de 92,9 e 100% para as amostras endocervicais e de urina, respectivamente. Quanto à especificidade os resultados foram igualmente bons, com 100% para os exsudados endocervicais e 99,1% para as amostras de urina (Catry *et al.*, 1995). O sucesso da utilização destas técnicas em amostras não invasivas como a urina de primeiro jacto facilita a adesão dos indivíduos assintomáticos a programas de rastreio (Quinn *et al.*, 1996; Crotchfelt *et al.*, 1997). A eficiência destes testes parece não ser influenciada pela presença ou ausência de sintomas (Jaschek *et al.*, 1993; Toye *et al.*, 1996), sendo a sua sensibilidade 20-30% superior à da cultura celular, pesquisa de antígenos e outros testes sem amplificação (Oliveira *et al.*, 2008).

Contudo, são técnicas em que contaminantes e inibidores representam o principal problema a nível da especificidade e sensibilidade, respectivamente (Radcliffe, 2001; CDC, 2002; Culler *et al.*, 2003; Carder *et al.*, 2006; ECDC, 2009). A técnica de LCR para o diagnóstico da infecção por *C.*



*trachomatis* foi descontinuada em 2003 pela empresa Abbott, devido a diversas queixas por parte dos laboratórios utilizadores de que estaria a produzir uma grande quantidade de falsos positivos, tanto em amostras como em controlos negativos, apresentando assim uma diminuição drástica na sua especificidade (Young *et al.*, 2003; Hadgu & Sternberg, 2009).

Quanto aos inibidores têm sido testados diversos métodos para os eliminar, ou pelo menos, para os reduzir e controlar. A manipulação das condições de armazenamento, bem como a introdução de controlos internos em todos os ensaios, são exemplos disso (Cribb *et al.*, 2002). As amostras de urina, por natureza, tendem a conter vários possíveis inibidores das polimerases. Num estudo realizado por Chong *et al.* em 1996, os autores concluíram que 18% das amostras de urina processadas continham inibidores da reacção de amplificação (Chong *et al.*, 1996, citado por Mahony *et al.*, 1998). Mahony *et al.*, propôs-se a identificar os principais inibidores da amplificação presentes nas amostras de urina, e a testar vários métodos de redução dos mesmos. Num total de 388 amostras de urina provenientes de 101 mulheres grávidas e de 287 não grávidas, obtiveram inibição em 11,9% das amostras de grávidas e em 5,2% das não grávidas. Identificaram ainda uma associação entre a presença de  $\beta$ -HCG e cristais e a ausência de amplificação pela técnica de PCR. O armazenamento a 4°C removeu os inibidores de 8/19 amostras inibidas e a -70°C foi eliminada a inibição em 16/19. Com uma diluição a 1:4 a inibição foi ultrapassada em 14/19 e a 1:10 em 16/19 amostras, tanto a 4°C como -70°C. Apenas com a extracção com fenol- clorofórmio os autores conseguiram eliminar os inibidores de todas as amostras em estudo (Mahony *et al.*, 1998).

Outros problemas inerentes à utilização dos NAAT no diagnóstico de rotina da infecção por *C. trachomatis* prendem-se com o seu custo elevado (ECDC, 2009) e fraca reprodutibilidade (Hadgu & Sternberg, 2009) o que parece estar relacionado com a baixa prevalência da infecção em algumas das populações estudadas (Jaschek *et al.*, 1993).

A interpretação de resultados positivos também requer alguma atenção, já que um resultado positivo num NAAT pode ser resultado de uma infecção activa, mas também de ADN residual que ficou de uma infecção passada, contaminação a nível laboratorial ou um falso positivo (Hadgu & Sternberg, 2009). Como forma de controlar os falsos positivos, o CDC recomenda que, um NAAT positivo seja confirmado com a repetição do mesmo teste na mesma amostra, com a repetição da mesma amostra com outro NAAT ou com a realização de um segundo teste numa nova amostra (CDC, 2002).

As principais vantagens que os NAAT trouxeram relacionam-se com o facto de não ser necessário utilizar microrganismos viáveis, poderem ser utilizadas em amostras não invasivas e permitirem o diagnóstico simultâneo de outras ISTs (Radcliffe, 2001)

Nos últimos anos, várias técnicas de PCR em tempo real têm sido elaboradas e optimizadas para estudos de farmacocinética e detecção qualitativa de *C. trachomatis*. Jalal *et al.* desenharam, em 2006, uma técnica de PCR em tempo real que permite também a quantificação, a qual, apesar de não ser importante em termos clínicos, pode contribuir para a compreensão da patogenicidade e dinâmica da infecção por *C. trachomatis*. Nesta técnica foram utilizados como alvos de amplificação três genes em simultâneo. O gene do plasmídeo críptico para a detecção qualitativa, o gene das MOMP para a quantificação e um controlo interno para detectar possíveis inibidores (Carder *et al.*, 2006). O gene do plasmídeo críptico não pode ser utilizado para quantificação, uma vez que está presente em multi-cópias, como já referido anteriormente (Jalal *et al.*, 2006 b).

A técnica de PCR em tempo real tem todas as vantagens de uma técnica de PCR, e permite ainda obter os resultados mais rapidamente, quando em comparação com a técnica convencional, sem prejuízo na sensibilidade ou especificidade. Num estudo realizado por Oliveira *et al.*, em 2008, foi comparado o desempenho entre uma técnica de PCR em tempo real e uma de imunofluorescência

directa. Com a primeira técnica os autores obtiveram uma percentagem de resultados positivos três vezes superior à obtida com a segunda, em mulheres que não apresentavam lesões do colo uterino, enquanto que, entre as mulheres que já apresentavam as referidas lesões as diferenças entre as duas técnicas não foram significativas (Oliveira *et al.*, 2008).

Teoricamente apenas uma cópia de ADN numa amostra é suficiente para que haja amplificação. No entanto, o produto resultante dessa amplificação pode não ser suficiente para ser detectado através de electroforese em gel de agarose. Uma forma de contornar esta limitação é introduzir uma técnica de *nested* PCR, a qual utiliza uma segunda amplificação a partir dos produtos da primeira, produzindo um aumento exponencial na quantidade de produto amplificado (Cribb *et al.*, 2002).

#### 4.6- Serotipagem de *C. trachomatis*

A identificação dos serovares de *C. trachomatis* pode ser feita pela análise do gene *omp1* por sequenciação, RFLP, por técnicas de hibridação (Quint *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2007) ou por microimunofluorescência (Black, 1997).

A sequenciação do gene *omp1* é uma forma de determinar com exactidão o serovar responsável pela infecção em causa. Contudo, não é adequada a um grande volume de trabalho e em casos de infecções mistas pode produzir resultados ambíguos (Zheng *et al.*, 2006).

As técnicas de RFLP são mais rápidas na obtenção de resultados e permitem identificar estirpes recombinantes, bem como infecções mistas, no entanto têm uma sensibilidade (49%) inferior à da sequenciação e a obtenção de bons resultados exige um fragmento com cerca de 1.1 kb (Zheng *et al.*, 2006).

## 5- Epidemiologia

A infecção urogenital causada por *C. trachomatis* é a doença bacteriana sexualmente transmissível mais comum na Europa, tanto em homens como em mulheres, segundo o “*European Guideline for the Management of Chlamidial Infection*” (Radcliffe, 2001). Segundo dados mais recentes do ECDC, em 2007 foram relatados 253 386 novos casos de infecção por *C. trachomatis* (ECDC, 2009).

A OMS estima que existam cerca de 90 milhões de novos casos desta infecção por ano mundialmente (Chernesky, 2005), dos quais apenas 5 milhões são diagnosticados na Europa Ocidental e 5 milhões na Europa de Leste e Ásia Central (Kučinskienė *et al.*, 2006). Já em 1996, a infecção causada por *C. trachomatis* era considerada a mais prevalente no Canadá e nos Estados Unidos da América (EUA) (Toye *et al.*, 1996).

Wilson *et al.* publicaram em 2002 uma revisão de vários estudos sobre a prevalência de *C. trachomatis* na Europa, efectuados no Reino Unido, Suécia, Holanda, Bulgária, França, Finlândia, Hungria, Itália e Espanha. Segundo estes, a prevalência da infecção por *C. trachomatis* em mulheres assintomáticas situou-se entre 1,7e 17% (Wilson *et al.*, 2002).

O estudo francês consultado pelos autores foi realizado por Chi Nguyen e colaboradores (1987). Utilizaram uma amostra de 306 mulheres assintomáticas, às quais foi colhido um exsudado cervical. Utilizando como método de diagnóstico a cultura celular, a prevalência foi de 17% (Chi Nguyen *et al.*, 1987, citado por Wilson *et al.*, 2002).

Na Finlândia, o estudo incidiu em 298 estudantes com idades compreendidas entre os 18 e os 40 anos. A técnica utilizada e o tipo de produto biológico foram iguais às do estudo francês. No entanto, a taxa de prevalência foi muito inferior, cerca de 6% (Paavonen & Veterinen, 1982, citado por Wilson *et al.*, 2002).

Uma amostra de 6161 mulheres com idades compreendidas entre os 20 e os 29 anos foi a utilizada no estudo húngaro tendo sido obtida uma taxa de prevalência de 5%. Uma técnica de Hibridação de RNA (Ácido Ribonucleico) foi utilizada para o diagnóstico (Nyári *et al.*, 1998, citado por Wilson *et al.*, 2002).

O estudo espanhol foi realizado entre 1990 e 1993, e os autores analisaram 6746 exsudados cervicais de mulheres com idades entre os 15 e os 35 anos acompanhadas numa consulta de planeamento familiar, e que mantiveram consultas regulares durante este período. A técnica efectuada foi a Hibridação de RNA. Este programa de rastreio teve uma grande eficácia, uma vez que a prevalência em 1990 era de 5,1% e diminuiu para 1% em 1993 (Marinas *et al.*, 1997, citado por Wilson *et al.*, 2002).

O estudo referente à Bulgária envolveu 231 mulheres com idades compreendidas entre os 16 e os 46 anos. Os autores efectuaram colheitas cervicais e uretrais e obtiveram uma prevalência de 6,1% através de técnicas de imunofluorescência directa e imunoenzimáticas (Tchoudomirova *et al.*, 1998, citado por Wilson *et al.*, 2002).

Relativamente à Holanda foram incluídos dois estudos. O primeiro, no qual a prevalência foi de 4,4%, estudou uma amostra de 2470 mulheres, através de técnicas de imunofluorescência directa em exsudados cervicais (Meijer *et al.*, 1989, citado por Wilson *et al.*, 2002). O segundo estudo, obteve uma taxa de prevalência muito semelhante (4,9%) com uma amostra de 2403 mulheres. Este último estudo apresentou uma grande vantagem, ao utilizar um tipo de amostra não invasiva, a urina de primeiro jacto (FVU, do inglês *First Void Urine*). Contudo, o facto de ter sido utilizada como técnica de diagnóstico a LCR (van den Hoek *et al.*, 1999, citado por Wilson *et al.*, 2002), pode ter originado resultados falsamente positivos, inflacionando assim a prevalência (Young *et al.*, 2003; Hadgu & Sternberg, 2009).

Em Itália, o estudo foi efectuado numa amostra de 1321 mulheres assintomáticas, tendo os autores utilizado uma técnica de imunofluorescência directa em exsudados cervicais e obtida uma prevalência de 3,9% (Italian MEGIC group, 1993, citado por Wilson *et al.*, 2002).

Foram também descritos dois estudos suecos, o primeiro envolvendo 306 mulheres com idades entre os 12 e os 25 anos, no qual se obteve uma taxa de prevalência de 6% e se utilizou a cultura celular como meio de diagnóstico (Persson *et al.*, 1991, citado por Wilson *et al.*, 2002). O segundo, com um desenho bastante diferente, estabeleceu uma comparação entre dois grupos, um grupo A com 751 estudantes e um grupo B com 619 mulheres de uma consulta de planeamento familiar. A média de idades foi de 18 anos em ambos os grupos. O diagnóstico baseou-se num teste imunoenzimático em FVU e as taxas de prevalência obtidas foram de 2% e 6%, respectivamente (Svensson *et al.*, 1994, citado por Wilson *et al.*, 2002).

No que respeita ao Reino Unido os autores seleccionaram quatro estudos, com taxas de prevalência bastante distintas. A tabela 1 apresenta um resumo dos mesmos (Wilson *et al.*, 2002).

|                           | Smith <i>et al.</i><br>1991* | Thompson <i>et al.</i><br>1994* | Hopwood <i>et al.</i><br>1999* | Kirkwood <i>et al.</i><br>1999* |
|---------------------------|------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Tamanho da amostra        | 197                          | 287                             | 1170                           | 97                              |
| Idade (anos)              | 19-58                        | 15-40                           | 16-25                          | >20                             |
| Tipo de produto biológico | Exsudado<br>Cervical         | Exsudado<br>Cervical            | Exsudado<br>Cervical           | FVU                             |
| Técnica de Diagnóstico    | Cultura<br>Celular           | IFD                             | EIA                            | PCR                             |
| Taxa de prevalência       | 12%                          | 1,7%                            | 3,9%                           | 6,2%                            |

FVU- Urina de primeiro jacto; PCR- Reacção em cadeia da polimerase; IFD- Ensaio de imunofluorescência directa; EIA- Ensaio imunoenzimático para pesquisa de antígenos; \*citado por Wilson *et al.*, 2002

**Tabela 2:** Resumo de quatro estudos realizados no Reino Unido com vista a determinar a taxa de prevalência para a infecção de *C. trachomatis*. Adaptado de Wilson *et al.*, 2002

Na revisão feita por Wilson *et al.* (2002), é visível uma grande discrepância nos valores de prevalência obtidos, quer em países vizinhos quer dentro do mesmo país (e.g. Reino Unido). Esta pode dever-se à diversidade de técnicas de diagnóstico utilizadas, mas também a diferentes populações alvo, e a tamanhos de amostra diversos.

Vários estudos apontam *C. trachomatis* como a bactéria sexualmente transmissível mais comum nos EUA, tanto em homens como em mulheres (CDC, 2006; Crotchfelt *et al.*, 1997; Quinn *et al.*, 1996; Jaschek *et al.*, 1993; Catry *et al.*, 1995).

Em 2009, o ECDC elaborou um relatório com base em estudos de prevalência da infecção por *C. trachomatis* em 29 países europeus, no qual considerou novamente esta como a infecção bacteriana sexualmente transmissível mais comum na Europa. Entre os países analisados apenas dois tinham programas de rastreio em curso. É dado aqui especial ênfase ao programa de rastreio nacional do Reino Unido (2005/06), com uma população-alvo constituída por jovens, de ambos os sexos, sexualmente activos com idades inferiores a 25 anos, tendo sido analisadas 97 000 amostras e calculada uma taxa de prevalência de 10,1%. Em treze dos 29 países não existia qualquer tipo de directiva relacionada com o diagnóstico da infecção por *C. trachomatis* e em seis foram identificados sistemas de rastreio oportunistas. Como no caso da Islândia, em que o rastreio é feito em mulheres que tenham sofrido aborto e na Estónia em mulheres grávidas ou com vários parceiros sexuais (ECDC, 2009).

Além de prevalente, a infecção por *C. trachomatis* constitui um grave problema de saúde pública devido à elevada percentagem de portadores assintomáticos (Catry *et al.*, 1995) e às complicações clínicas que daí podem resultar. As taxas de infecção entre adultos sexualmente activos situam-se geralmente entre os 5 e os 10% (ECDC, 2009). Contudo, se falarmos de populações em que o

número de parceiros é mais elevado, com adição a drogas ou história de IST a prevalência pode ir até 27% (Bernstein *et al.*, 2006).

Os estudos tendo como alvo a população em geral são raros, a prevalência de infecção por *C. trachomatis* não é conhecida na maioria dos países e rastreios preventivos a populações consideradas de alto risco também não são comuns, o que deixa uma elevada percentagem de infectados assintomáticos por diagnosticar (Kučinskienė *et al.*, 2006), sendo estes últimos um reservatório permanente da bactéria (Zheng *et al.*, 2006).

Cerca de 50-75% das mulheres infectadas são assintomáticas (Chernesky, 2005; Zheng *et al.*, 2006; Quinn *et al.*, 1996; Toye *et al.*, 1996; Chernesky, 2005; Jaschek *et al.*, 1993; Quint *et al.*, 2007), sendo que os homens assintomáticos se situam entre 25-50% dos infectados (CDC, 2006); 60-70% dos recém-nascidos de mães infectadas são contaminados durante o parto, dos quais 18-50% desenvolve conjuntivite nos primeiros dias de vida e 3-15% desenvolve pneumonia nos primeiros meses (Schachter & Stephens, 2008; Kakar *et al.*, 2010).

Embora a prevalência mais elevada de infecção se verifique em mulheres sexualmente activas entre os 15 e os 19 anos (CDC, 2006), considera-se como população de risco tanto os homens como as mulheres sexualmente activos na faixa etária dos 15 aos 30 anos. Taxas de incidência superiores estão relacionadas com o número de parceiros sexuais (ECDC, 2008).

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento nas taxas de prevalência de *C. trachomatis*, o que provavelmente não é real, uma vez que também resulta do aumento dos rastreios e da vigilância epidemiológica activa em alguns países e da introdução de novos testes de diagnóstico mais sensíveis (ECDC, 2009). A prevalência superior nas mulheres poderá ser consequência de uma vigilância mais apertada, já que são os principais alvos dos poucos programas de rastreio existentes (Stamm, 2008).



Segundo um estudo realizado por Valkengoed *et al.* em 2001, um programa de rastreio universal em mulheres dos 15-40 anos não se justifica em termos de custo/benefício. No caso de um rastreio universal em mulheres dos 15-25 anos os custos associados diminuem 30%, ainda assim, para uma prevalência entre 2-4% os custos superam largamente os benefícios. Os autores tiveram em conta todos os gastos directos e indirectos com a notificação das participantes via postal, laboratoriais, associados ao tratamento, ao seguimento das participantes pós-tratamento e a todos os recursos poupados por cada complicação clínica evitada. Nesta população um rastreio universal de todas as mulheres entre os 15-40 anos (n= 161 065), iria evitar 59 casos de doença inflamatória pélvica, três de infertilidade tubária, seis de gravidez ectópica, nove de dor pélvica crónica e 13 de pneumonia no recém-nascido. Os autores não tiveram em conta qualquer critério selectivo, isto é, a selecção das participantes foi completamente aleatória sem ter em conta nenhum dos factores de risco conhecidos, foram inclusive testadas mulheres que não eram sexualmente activas. Tendo em conta estes resultados, um programa de rastreio com base em critérios de selecção muito específicos será a única opção para a elaboração de um rastreio em grande escala em que haja uma boa relação custo/benefício (Valkengoed *et al.*, 2001).

Assim, para os programas de rastreio serem eficazes é necessário que sejam bem direccionados, pelo que é muito importante o estudo de prevalência, de transmissão do microrganismo localmente e em vários grupos populacionais, o que vai de encontro aos objectivos deste estudo. Vários autores (CDC, 2006; ECDC, 2009; Chernesky, 2005) recomendam o rastreio de *C. trachomatis* em:

1. Homens, uretrite não gonocócica, uretrite pós-gonocócica, peri-hepatite, epididimite, orquite, dadores de esperma, contacto sexual com indivíduo com infecção por *C. trachomatis*;

2. Mulheres com cervicite muco-purulenta, síndrome uretral, cistite com cultura negativa, hemorragia, endometrite, salpingite, peri-hepatite, dor pélvica, gonorreia, contacto sexual com indivíduo com infecção por *C. trachomatis*, grávidas;
3. Homens e mulheres com disúria com cultura negativa, proctite, artrite reactiva, síndrome inguinal ou úlcera genital;
4. Recém-nascidos e crianças com conjuntivite ou pneumonia.

Em Portugal não existe um plano de acção específico para a prevenção e controlo da infecção por *C. trachomatis*, nem normas gerais de rastreio para este microrganismo apesar dos testes de diagnósticos estarem disponíveis em alguns hospitais públicos e principais laboratórios (ECDC, 2008).

Em Portugal, existem poucos estudos sobre a prevalência da infecção por *C. trachomatis* e a distribuição epidemiológica das estirpes nos vários grupos sociais. Embora em 2002, Brito e Sá *et al.* tenham efectuado um estudo em que utilizaram uma técnica de PCR em amostras de urina de 1108 mulheres, entre os 14 e os 30 anos, da área de Lisboa para pesquisa de *C. trachomatis* e tivessem obtido uma prevalência de cerca de 4,6% não foram encontradas evidências estatísticas que relacionassem a prevalência com os factores socioeconómicos avaliados (idade, etnia, idade de início da vida sexual, número de parceiros sexuais nos três meses anteriores e utilização do preservativo) (Brito e Sá *et al.*, 2002).

## 6- Infecção por *Neisseria gonorrhoeae*

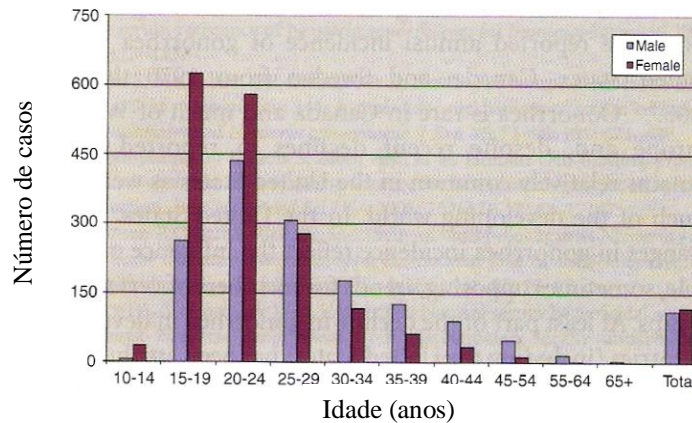
As bactérias da espécie *N. gonorrhoeae* pertencem à Família *Neisseriaceae*, tendo sido descritas pela primeira vez em 1879 por Neisser (Gaydos & Quinn, 1999). *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis* são as duas espécies patogénicas mais importantes do género, uma vez que as restantes são essencialmente bactérias comensais, que raramente se comportam como patogénicas (Sparling, 2008).

As bactérias da espécie *N. gonorrhoeae* são microrganismos aeróbios estritos, coram negativamente pela coloração de Gram e apresentam-se como diplococos imóveis e não formadores de esporos (Exposto, 2000). A sua célula bacteriana é constituída por um invólucro polissacárido (Sparling, 2008), uma membrana citoplasmática, uma parede celular rica em peptidoglicano, uma membrana externa e pili. São de crescimento fastidioso e a sua cultura *in vitro* requer meios enriquecidos com vitaminas, minerais e aminoácidos (Hjelmevoll *et al.*, 2006; Exposto, 2000).

Esta espécie de bactérias adere às mucosas e penetra no interior das células epiteliais do hospedeiro com o auxílio de pili. O homem é o seu único hospedeiro natural e o contágio, praticamente, só se faz por via sexual ou verticalmente no caso de recém-nascidos de mães infectadas (Sparling, 2008), embora em casos raros se tenha colocado a hipótese de transmissão não sexual, relacionada com o contacto íntimo com objectos infectados (Lanigan-O’Keefe, 1974; Tsai *et al.*, 2006).

A infecção por esta bactéria é reconhecida como responsável por infecção sexualmente transmissível desde o século XIII. Actualmente, há poucos países com registos precisos da incidência e da prevalência deste microrganismo nas populações. Tal como no caso das infecções associadas a *C. trachomatis*, também na infecção por *N. gonorrhoeae* se verifica uma forte

associação com a idade (gráfico 1). Em 2005, 75% dos casos relatados nos EUA foram referentes a indivíduos com idades compreendidas entre os 15 e os 29 anos (Hook & Handsfield, 2008).



**Gráfico 1:** Idade e sexo dos casos de infecção por *N. gonorrhoeae* relatados em 2005 nos Estados Unidos da América. Adaptado de Hook & Handsfield, 2008

No homem, a uretrite aguda purulenta é a manifestação mais comum da infecção por *N. gonorrhoeae*. O período de incubação é geralmente de 1-14 dias, mas na maioria dos casos manifesta-se nas primeiras 24-72h após o contacto sexual com o indivíduo infectado (Hook & Handsfield, 2008). Os principais sintomas são disúria, corrimento uretral, edema e eritema do meato uretral. Sem tratamento, a uretrite gonocócica geralmente resolve-se espontaneamente em algumas semanas. Contudo, são conhecidas algumas complicações, e a infecção pode estender-se à próstata, vesículas seminais, glândulas de Cowper e de Tyson, epidídimo, testículos e evoluir para proctite crónica (Hook & Handsfield, 2008).

Na mulher, o principal alvo de infecção é o canal endocervical, seguido da uretra. O período de incubação é mais variável do que no homem, mas geralmente ocorre até dez dias após o início da infecção. Os principais sintomas incluem corrimento vaginal, disúria, hemorragia inter-menstrual (Hook & Handsfield, 2008) e dor abdominal. O tropismo desta bactéria estende-se às células das

glândulas de Bartholin, das trompas de Falópio e dos ovários, podendo em última instância causar doença inflamatória pélvica e infertilidade (Exposto, 2000; Sparling, 2008). A doença inflamatória pélvica aguda é a complicação mais comum na mulher, geralmente inicia-se com salpingite e endometrite, abscessos nas trompas de Falópio e ovários ou peritonite pélvica (Hook & Handsfield, 2008).

Na mulher grávida as manifestações clínicas são idênticas às da mulher não grávida, à excepção da menor probabilidade de desenvolver doença inflamatória pélvica. As principais complicações incluem gravidez ectópica, aborto, ruptura prematura das membranas, parto prematuro e infecção aguda das membranas placentárias, além do contágio do recém-nascido no momento do parto (Hook & Handsfield, 2008).

Em ambos os sexos *N. gonorrhoeae* pode causar infecção rectal, frequente em mulheres e em indivíduos homossexuais, muitas vezes assintomática nas mulheres, mas com tendência a evoluir para proctite nos homens. A infecção gonocócica da faringe, bastante rara em homens heterossexuais, ocorre em 10-20% das mulheres infectadas e em 10-25% dos homens homossexuais. A conjuntivite purulenta no adulto é rara. A infecção por *N. gonorrhoeae* pode evoluir para infecção gonocócica disseminada (IGD). Esta manifesta-se por um síndrome agudo de artrite, dermatite e/ou tenosinovite. Em 50% dos casos de IGD as hemoculturas são positivas. Esta passagem da bactéria para a corrente sanguínea pode, muito raramente, resultar em endocardite gonocócica, que por comprometer a competência da válvula aórtica pode levar à morte em poucas semanas. Também bastante raro é a meningite gonocócica, estando descritos pouco mais de duas dezenas de casos (Hook & Handsfield, 2008).

Os indivíduos do sexo masculino infectados revelam sintomas numa fase muito precoce da doença, o que contribui para que procurem cuidados médicos rapidamente, prevenindo sequelas e maior

disseminação da doença, em oposição ao que acontece na infecção por *C. trachomatis* que, pela elevada percentagem de infecções assintomáticas que causa, tem maior probabilidade de evoluir para complicações clínicas por falta de tratamento. Já nas mulheres, e tal como referido para *C. trachomatis*, o quadro é frequentemente assintomático (Hook & Handsfield, 2008).

Desde 1880, que a conjuntivite neonatal é reconhecida como uma infecção relacionada com infecção genital na mãe, quando Credé publicou um relato em que detalhava os efeitos de uma profilaxia com nitrato de prata nos recém-nascidos. Esta infecção era na altura uma das mais frequentes entre recém-nascidos. Num estudo recente realizado no Quênia, 42% de 67 recém-nascidos que não receberam profilaxia desenvolveram conjuntivite neonatal, caracterizada por conjuntivite mucopurulenta que, geralmente, surge até 2 dias após o nascimento (Kohlhoff & Hammerschlag, 2008). Em áreas em que a prevalência da infecção por *N. gonorrhoeae* é superior a 1% ou em que o rastreio na grávida não é efectuado por rotina, a profilaxia no recém-nascido é recomendada (Hitti & Watts, 2008). Segundo o CDC, todas as mulheres sexualmente activas com menos de 25 anos constituem um grupo de risco para infecção gonocócica. São ainda identificados outros factores de risco como infecção prévia por *N. gonorrhoeae* ou outra IST, parceiros sexuais recentes ou múltiplos, utilização intermitente do preservativo, praticantes de sexo a troco de dinheiro ou utilização de drogas (CDC, 2006).

Surgem anualmente nos EUA cerca de 600 000 novos casos de infecção por *N. gonorrhoeae* (CDC, 2006) e a OMS estima que mundialmente o número anual de novos casos seja cerca de 62 milhões (OMS, 2001).

A pesquisa de *N. gonorrhoeae* pode ser feita em exsudados, urina e sangue. Os exsudados devem ser enviados ao laboratório o mais rapidamente possível, e em meio de transporte adequado, de

preferência com carvão caso seja para microscopia e/ou identificação por cultura (Fallon & Young, 1993).

O diagnóstico laboratorial pode ser feito por observação directa de esfregaço corado por técnica de coloração de Gram, em que a presença de diplococos de coloração de Gram negativos no interior de leucócitos polimorfonucleares é sugestiva de infecção activa (Kohlhoff & Hammerschlag, 2008; Gaydos & Quinn, 1999). A microscopia, apesar de muito eficaz em casos de indivíduos do sexo masculino com uretrite mucopurulenta, já que a sua sensibilidade é cerca de 90-95%, tem uma utilidade muito limitada nas mulheres devido à sua baixa sensibilidade, entre 55-60% (Falon & Young, 1993; Exposto, 2000; Sparling, 2008).

A cultura continua a ser considerada a técnica padrão no diagnóstico da infecção por *N. gonorrhoeae*, uma vez que apresenta uma sensibilidade que ronda os 80-95% em infecções agudas, uma especificidade perto dos 100% e é o único método disponível para determinar a sensibilidade aos antibióticos (Whiley *et al.*, 2006). As principais desvantagens desta metodologia prendem-se essencialmente com a utilização exclusiva de amostras invasivas, a demora na obtenção de resultados e a exigência de condições de transporte que assegurem a viabilidade da bactéria (Hook & Handsfield, 2008). O outro aspecto importante é a sensibilidade bastante mais baixa quando se trata de infecções crónicas uma vez que nestas situações pode chegar aos 50% (Whiley *et al.*, 2006).

A cultura deve ser feita em meio selectivo com antibióticos para inibir a flora comensal, que se incuba a 37°C em atmosfera de 3-5% CO<sub>2</sub>, durante 72h (Exposto, 2000; Sparling, 2008). Na década de 90, o meio de eleição era o de Thayer-Martin que contém os antibióticos vancomicina, colistina e nistatina. Contudo o facto de, alguns estudos terem posto em causa a capacidade da nistatina inibir o crescimento de fungos como *Cândida albicans*, assim como a identificação de uma mutação que aumenta a permeabilidade da membrana produzindo estirpes de *N. gonorrhoeae* sensíveis à

vancomicina, levaram à substituição deste meio pelo de Thayer-Martin modificado (Falon & Young, 1993). Actualmente, o meio Gelose Chocolate PolyViteX VCAT3 é bastante utilizado, mas com o cuidado de lhe ser associado em paralelo uma cultura em meio não selectivo, pelo motivo acima mencionado (Biomérieux, 2003).

A baixa sensibilidade e especificidade dos ensaios serológicos disponíveis, bem como a persistência de anticorpos muito após o fim da infecção activa, têm limitado a utilidade destes testes (Falon & Young, 1993), sendo actualmente substituídos por outros métodos de diagnóstico como as técnicas de Hibridação de ARN ribossomal e os NAAT (Exposto, 2000).

A utilização dos NAAT neste tipo de diagnóstico tem várias vantagens como a sua elevada sensibilidade em infecções sintomáticas e assintomáticas, tornando-os bastantes úteis em programas de rastreio, o facto do resultado não depender da viabilidade do microrganismo e o ser aplicável a amostras não invasivas. Apresentam como desvantagens os custos elevados, a possibilidade de ocorrerem contaminações cruzadas e inibições. Por fim, mas mais difíceis de controlar, as limitações relacionadas com a sequência genética, podendo daí resultarem resultados falsos negativos ou falsos positivos. No primeiro caso, as sequências utilizadas como alvo podem não estar presentes em algumas estirpes e no segundo caso podem ser comuns a outras espécies do género. Este tipo de testes ainda não está aprovado para ser utilizado em exsudados faríngeos e rectais, o que também limita o seu espectro de utilização (Whiley *et al.*, 2006).

*N. gonorrhoeae* possui vários plasmídios, dos quais o mais pequeno é o pJDI de 4.2 kb, que está presente em cerca de 96% dos isolados, desconhecendo-se a sua função (Ho *et al.*, 1992). Um dos genes presentes neste plasmídio, o *ccpB* (641 pb), tem sido utilizado como alvo de amplificação em algumas técnicas de PCR para o diagnóstico de infecções causadas por esta espécie. Apesar do produto deste gene já ter sido detectado em estirpes sem o plasmídio (Ho *et al.*, 1992), estão



descritas estirpes sem o gene *ccpB*, havendo assim a possibilidade de resultados falsos negativos (Palmer *et al.*, 2003, Tapsall *et al.*, 2003, citados por Whiley *et al.*, 2004). Como previamente mencionado, existe ainda o risco de resultados falsos positivos, já que outras espécies do género *Neisseria*, tal como *N. cinerea*, podem possuir este gene (Palmer *et al.*, 2003, citado por Whiley *et al.*, 2004). Para contornar estas limitações tem sido utilizado como alternativa o pseudogene porA, que até à data não foi identificado em bactérias comensais do género *Neisseria* (Whiley *et al.*, 2004).

Crotchfelt e colegas compararam o desempenho de uma técnica de PCR com a cultura quando aplicados em exsudados uretrais, endocervicais e urina. A técnica de PCR revelou-se superior à cultura em termos de sensibilidade em todos os casos. A especificidade da cultura foi de 100%, tanto nos exsudados uretrais como nos endocervicais, enquanto que na técnica de PCR ficou entre os 95,9% em amostras de urina provenientes de indivíduos do sexo feminino e os 99,4% em exsudados endocervicais (Crotchfelt *et al.*, 1997).

As bactérias desta espécie são habitualmente sensíveis a antibióticos como a penicilina, estreptomicina, tetraciclina e eritromicina. Contudo, nas últimas décadas tem sido registada uma diminuição na susceptibilidade de *N. gonorrhoeae* aos antibióticos mais utilizados (Falon & Young, 1993) e estão já descritas resistências a alguns antibióticos, nomeadamente à penicilina, tetraciclinas, eritromicina, quinolonas e outros (Sparling, 2008; Srifeungfung, 2009).

Recentemente foram clarificados os conceitos de multi-resistente e extensivamente resistente no caso da *N. gonorrhoeae*. Pertencem ao primeiro grupo as estirpes que sejam resistentes a um dos antibióticos da categoria I (cefalosporinas injectáveis, cefalosporinas orais e espectinomicina) e a dois ou mais da categoria II (penicilinas, fluoroquinolonas, azitromicina, aminoglicosídeos e carbapenemes) e pertencem ao segundo grupo as estirpes que possuam resistência aumentada a dois

ou mais antibióticos da categoria I e a três ou mais da categoria II. Para já, só estão descritos casos de estirpes multi-resistentes (Bala & Sood, 2010).

São conhecidos dois tipos de resistência à penicilina e às tetraciclinas: resistência mediada por plasmídios e/ou resistências por mecanismos cromossómicos. No caso da penicilina, a resistência mediada por plasmídios deve-se essencialmente à produção de  $\beta$ -lactamase, enquanto que a resistência por mecanismos cromossómicos ainda não está completamente compreendida e é bastante mais complexa, uma vez que envolve mutações e deleções em vários *locus* do cromossoma. Quanto às tetraciclinas, a resistência mediada por plasmídios resulta da produção de uma proteína, TetM, e a resistência por mecanismos cromossómicos envolve um conjunto de mutações, que não só diminuem a entrada do antibiótico na célula, como aumentam a velocidade a que este é expulso (Hu *et al.*, 2005). No caso da azitromicina, as resistências encontradas estão frequentemente associadas a uma mutação no gene *mtrR* ou à presença do gene *mef* o que, em ambos os casos, resulta numa produção aumentada de bombas de efluxo (Galarza et al., 2010). Já a resistência da *N. gonorrhoeae* às fluoroquinolonas parece estar associada a mutações ao nível do alvo deste antibiótico na célula, a proteína GyrA (Knapp *et al.*, 1997).

## II- Objectivos

### Objectivo Geral

Dada a falta de dados consistentes sobre a infecção por *Chlamydia trachomatis* e de *Neisseria gonorrhoeae* em Portugal, o objectivo geral do presente trabalho foi avaliar as prevalências das infecções por estas bactérias nas grávidas e recém-nascidos da consulta de Obstetrícia do Hospital Amadora Sintra, devido à importância da transmissão ao recém-nascido.

### Objectivos Específicos

- Identificar os genótipos de *C. trachomatis* existentes nesta população.
- Caracterizar a variação da prevalência de infecção por *C. trachomatis* em função da idade.
- Verificar a utilidade de uma técnica de PCR *multiplex* e de uma técnica de PCR *multiplex* em tempo real no diagnóstico de infecções por *C. trachomatis*.

### III- Material e Métodos

#### 1- População

A população estudada foi constituída por todas as utentes grávidas de 36 semanas, que durante o período que decorreu entre Outubro de 2010 e Abril de 2011 foram observadas na Consulta de Obstetrícia do Hospital Amadora Sintra e que aceitaram participar no rastreio. Incluíram-se também os recém-nascidos de mães em que foi detectada infecção por *Chlamydia trachomatis* e/ou *Neisseria gonorrhoeae*.

A cada grávida foi pedido que colhesse uma amostra de urina de primeiro jacto e na consulta foi colhido um exsudado endocervical. Aos recém-nascidos foi colhido um exsudado ocular.

Todas as utentes foram instruídas sobre o modo de proceder à colheita pelas médicas obstetras, que as observaram, tendo-lhes sido explicado o processo, os objectivos do estudo e pedido que assinassem um consentimento informado (Anexo A) e preenchessem um breve questionário (Anexo B).

Os exsudados oculares foram colhidos pelas médicas pediatras aos recém-nascidos de mães infectadas por *C. trachomatis* e/ou *N. gonorrhoeae*, às quais tinha sido comunicado que deveriam trazer os seus recém-nascidos (no caso de partos não realizados no Hospital) para observação e colheita de amostras, uma vez que poderiam ter-lhes transmitido a(s) infecção(ões).

As grávidas cujo resultado foi positivo para infecção por *C. trachomatis* e/ou *N. gonorrhoeae* foram informadas, foi-lhes prescrita a antibioterapia adequada e pedido que voltassem à consulta, três semanas depois, a fim de efectuarem nova colheita de urina para controlo pós-terapêutica. Também foi prescrita terapêutica para os parceiros sexuais, embora o acompanhamento destes não esteja incluído no estudo.

Cristina Isabel dos Santos Paixão Lobato

## 2- Métodos

### 2.1- Colheita de amostras na grávida

#### Urina

A cada grávida foi entregue um contentor esterilizado e dada a instrução para colher entre 15 a 30 ml de urina, incluindo o primeiro jacto, após uma abstinência urinária de no mínimo uma hora (CDC, 2006; Carder *et al.*, 2006).

As amostras foram mantidas em arca refrigerada a 4°C no Hospital até serem transportadas para a Unidade de Ensino e Investigação de Doenças Sexualmente Transmissíveis (UEIDST) do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT).

Efectuaram colheita de urina para pesquisa de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* por técnicas de biologia molecular 1201 grávidas.

#### Exsudado endocervical

Os exsudados endocervicais foram colhidos pelos obstetras do Hospital Amadora Sintra, segundo as directrizes do CDC, para pesquisa e identificação de *N. gonorrhoeae* por cultura. A zaragatoa foi introduzida no canal endocervical, cerca de 1 a 2 centímetros em profundidade e rodada durante 15 a 30 segundos contra as paredes, de modo a colher células, de seguida foi retirada, cuidadosamente sem tocar na mucosa vaginal, e enviada de imediato ao laboratório da instituição (CDC, 2002).

## 2.2- Colheita de amostras no recém-nascido

### Exsudados Oculares

Aos recém-nascidos de mães em que tivesse sido detectada algumas das ISTs em estudo, foi colhido um exsudado ocular. Cada amostra foi mantida a 4°C em meio de transporte SP2, até serem processados na UEIDST do Instituto de Higiene e Medicina Tropical. No total foram colhidos 18 exsudados oculares.

## 2.3- Preparação da amostra

Com o objectivo de obter a máxima concentração de células presentes nas amostras de urina, cada uma delas foi centrifugada, na sua totalidade, a 4000 rotações por minuto (rpm), a 4°C durante 40 minutos numa centrífuga refrigerada “*Centrifuge 5810 R*”, Eppendorf. O sobrenadante foi removido de modo a obter cerca de 1,5 ml de sedimento urinário, ressuspendeu-se através de agitação vigorosa e separou-se em 2 aliquotas. Uma foi congelada a -80°C para estudos posteriores e a outra foi mantida a 4°C durante 24h para diminuir a presença de possíveis inibidores presentes na amostra e utilizada para a extracção de ADN.

## 2.4- Extracção de ADN

A extracção de ADN foi efectuada com o kit comercial JETQUICK® Blood & Cell Culture DNA Spin Kit (Genomed, Löhne, Alemanha) com as seguintes modificações às instruções do fabricante.

Nas amostras de urina extraiu-se a partir de 400 µl e não dos 200 µl recomendados. Antes da extracção e com o objectivo de verificar a existência ou não de inibição da amplificação nas técnicas de PCR utilizadas, adicionou-se a todas as amostras 3 µl de uma solução de controlo interno. Este consistiu numa sequência oligonucleotídica de 100 pb sintetizada pela casa comercial QUILABAN (TIB<sup>®</sup>MOLBIOL, Berlim, Alemanha) e descrita por Jalal *et al.* (2006). À mistura amostra/CI adicionou-se 20 µl de protease (Genomed, 20 µg/ ml) e 200 de tampão k1, tendo-se incubado durante 10 minutos a 58°C. Posteriormente, adicionou-se 200 µl de etanol absoluto, misturando de imediato para evitar a formação de precipitação e transferiu-se tudo para uma coluna de afinidade Jetquick. Alternando com centrifugações rápidas adicionou-se os tampões de lavagem. Por fim o ADN foi eluído da coluna com o tampão de eluição.

As amostras que resultaram inibidas pela técnica de PCR, foram novamente extraídas a partir das aliquotas previamente congeladas a -80°C, utilizando os kits comerciais QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini (grupo QIAGEN, IZASA Portugal) e DNA/RNA Virus Mini Kit (Invitek, Berlim, Alemanha), segundo as instruções dos respectivos fabricantes. Em qualquer dos casos, foram também adicionados 3 µl de controlo interno diluído a 1:5000.

No kit comercial QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini a amostra (140 µl) sofre lise através de condições desnaturantes, sendo o pH ajustado de seguida para permitir uma ligação óptima dos ácidos nucleicos à membrana de sílica da coluna. Todos os contaminantes, inibidores, nucleases e outras proteínas são eliminados através de lavagens com os diferentes tampões. Este kit não separa ARN de ADN, e por isso ambos são extraídos e purificados. Uma vez que o objectivo era extrair e purificar ADN, não se adicionou o “RNA carrier”, cuja função seria proteger o ARN da degradação, tendo sido esta a única alteração às instruções do fabricante. Para o sistema comercial DNA/RNA Virus Mini Kit o princípio da extracção é idêntico, mas utilizou-se 200 µl de amostra.

## 2.5- Identificação de *C. trachomatis* por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos

### 2.5.1- Polimerase Chain Reaction (PCR) *multiplex*

Todas as amostras foram testadas por uma técnica de PCR *multiplex*, utilizando como alvos de amplificação sequências conhecidas do plasmídeo críptico e do gene *omp1* para a detecção de *C. trachomatis*, e uma pequena sequência sintetizada artificialmente que funcionou como controlo interno (QUILABAN, TIB<sup>®</sup>MOLBIOL, Berlim, Alemanha).

#### 2.5.1.1- Descrição dos primers

Os primers utilizados foram produzidos e fornecidos pela casa comercial QUILABAN (TIB<sup>®</sup>MOLBIOL, Berlim, Alemanha) e as suas sequências estão descritas na tabela 3.

|   |                     |
|---|---------------------|
| <b>Primer para o plasmídeo críptico</b>                               |                     |
| HJ-plasmid-1- <i>Forward primer</i> 5-AAC CAA GGT CGA TGT GAT AG-3    | Fragmento de 149 pb |
| HJ-plasmid-2- <i>Reverse primer</i> 5-TCA GAT AAT TGG CGA TTC TT-3    |                     |
| <b>Primer para o gene <i>omp1</i></b>                                 |                     |
| HJ-MOMP-1- <i>Forward primer</i> 5-GAC TTT GTT TTC GAC CGT GTT-3      | Fragmento de 218 pb |
| HJ-MOMP-2- <i>Reverse primer</i> 5-ACA RAA TAC ATC AAA RCG ATC CCA-3  |                     |
| <b>Primer para o Controlo Interno</b>                                 |                     |
| <i>Internal control forward primer</i> 5-GTG CTC ACA CCA GTT GCC GC-3 | Fragmento de 100 pb |
| <i>Internal control reverse primer</i> 5-GCT TGG CAG CTC GCA TCT CG-3 |                     |

**Tabela 3:** Sequências dos primers seleccionados e comprimento dos respectivos fragmentos amplificados, segundo a técnica descrita por Jalal *et al.*, 2006 (b)



Os primers que têm como alvo de amplificação o plasmídio críptico flanqueiam um fragmento de 149 pb com a sequência que se pode observar na figura 4:

| <b>Chlamydia trachomatis cryptic plasmid pLGV440</b> |   |         |     |          |                 |
|--|---|---------|-----|----------|-----------------|
| LOCUS  | X06707  | 7500 bp | DNA | circular | BCT 29-JUL-2008 |
| DEFINITION   | Chlamydia trachomatis cryptic plasmid pLGV440.  |         |     |          |                 |
| ACCESSION  | X06707  |         |     |          |                 |
| VERSION  | X06707.3 GI:194680626   |         |     |          |                 |
| KEYWORDS   | AT-rich region; ORF1; ORF2; ORF3; ORF4; ORF5; ORF6; ORF7; plasmid; tandem repeat; unidentified reading frame.   |         |     |          |                 |
| SOURCE   | Chlamydia trachomatis   |         |     |          |                 |
| ORGANISM   | <a href="#">Chlamydia trachomatis</a>   |         |     |          |                 |
| REFERENCE  | 1 (bases 1 to 7498)   |         |     |          |                 |
| AUTHORS  | Hatt,C., Ward,M.E. and Clarke,I.N.  |         |     |          |                 |
| TITLE  | Analysis of the entire nucleotide sequence of the cryptic plasmid of Chlamydia trachomatis serovar L1. Evidence for involvement in DNA replication  |         |     |          |                 |
| JOURNAL  | Nucleic Acids Res. 16 (9), 4053-4067 (1988)   |         |     |          |                 |
| PUBMED   | <a href="#">2836808</a>   |         |     |          |                 |
| ORIGIN   | <pre> 1  tttgcaactc ttggtggtag actttgcaac tcttggtggt agactttgca actccttggtg 61  gtagactttg caactccttg tggtagactt ggtcataatg gacttttggt gaaaaatttc 121 ttaaaatctt agagctccga ttttgaatag ctttggttaa gaaaatgggc tcgatggctt 181 tccataaaaag taggttggtc ttaacttttg gggacgcgtc ggaaatttgg ttatctactt 241 tatctcatct aactagaaaa aattatgcgt ctgggattaa ctttcttggt tctttagaga ... 7141 ccgcatatat tttggccgct agaaaaggcg atttaaa<b>aac</b> <b>caagggtcgat</b> <b>gtgatag</b>gga 7201 aagtatgtgg aatgtcgaac tcatcggcga taagggtggt ggatcaattt cttccttcat 7261 ctagaaacaa agacgttaga gaaacgatag ataagtctga ttcagag<b>aag</b> <b>aatcgccaat</b> 7321 <b>tatctga</b>ttt cttaatagag atacttcgca tcatgtgttc cggagtttct ttgtcctcct 7381 ataacgaaaa tcttctacaa cagctttttg aactttttaa gcaaagagc tgatcctcgc // </pre> |         |     |          |                 |

**Figura 4:** Fragmento do plasmídio críptico. A laranja o *Forward primer* e a vermelho o *Reverse primer*, delimitam o fragmento amplificado. Fonte: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X06707.3?report=gbwithparts&log\\$=seqview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X06707.3?report=gbwithparts&log$=seqview)

Os primers que têm como alvo de amplificação o gene *omp1* flanqueiam um fragmento de 218 pb com a seguinte sequência (figura 5):

**C.trachomatis (Da/TW-448) omp1 gene for major outer membrane protein**

LOCUS X62921 1325 bp DNA linear BCT 25-JUL-1993  
 DEFINITION C.trachomatis (Da/TW-448) omp1 gene for major outer membrane protein.  
 ACCESSION X62921 S45921  
 VERSION X62921.1 GI:40718  
 SOURCE Chlamydia trachomatis  
 ORGANISM [Chlamydia trachomatis](#)  
 Bacteria; Chlamydiae; Chlamydiales; Chlamydiaceae; Chlamydia.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1325)  
 AUTHORS Sayada,C., Denamur,E. and Elion,J.  
 TITLE Complete sequence of the major outer membrane protein-encoding gene of Chlamydia trachomatis serovar Da  
 JOURNAL Gene 120 (1), 129-130 (1992)  
 PUBMED [1398119](#)  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1325)  
 AUTHORS Denamur,E.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (04-NOV-1991) E. Denamur, Hopital Robert DEBRE, Laboratoire de Biochimie Genetique, 48, Bld. Serurier, 75019 Paris, FRANCE  
 ORIGIN  
 1 ttctctcaggc cattaattgc tacaggacat cttgtctggc ttttaactagg acgcagtgcc  
 61 gccagaaaaa gatagcgagc acaagagag ctaattatac aatccttagag gtaagaatga  
 121 aaaaactctt gaaatcggta ttagtatttg ccgctttgag ttctgcttcc tccttgcaag  
 181 ctctgcctgt ggggaatcct gctgaaccaa gccttatgat cgacggaatt ctgtgggaag  
 241 gtttcggttg agatccttgc gatccttgca ccacttggtg tgacgctatc agcatgcgta  
 301 tgggttacta tggagacttt gttttcgacc gtggtt ttgga aacagatgtg aataaagaat  
 361 tccacatggg tgccaagcct acaactgata caggcaatag tgcagctcca tccactctta  
 421 cagcaagaga gaatcctgct tacggccgac atatgcagga tgctgagatg tttacaaatg  
 481 ccgcttgcat ggcattgaat atttgggata gttttgatgt attctgtaca ttaggagcca  
 541 ccagtggata tcttaaagga aactctgctt ctttcaattt agttggattg tttggagata  
 //

**Figura 5:** Fragmento do gene *omp1*. A laranja o *Forward primer* e a vermelho o *Reverse primer*, delimitam o fragmento amplificado. Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X62921.1>

Os primers dirigidos para o Controlo Interno flanqueiam um fragmento de 100 pb sintetizado artificialmente com a seguinte sequência: 5' GTGCTCACAC CAGTTGCCGC GGAAAGTATG TGGAATGTTA ACACACCCAC ACCACACCCA CACACGTGTT GGATCAATTT CGAGATGCGA GCTGCCAAGC 3'.

### 2.5.1.2- Preparação da mistura de reacção

Na preparação da mistura de reacção da técnica de PCR *multiplex* utilizaram-se os primers supra mencionados, água bidestilada desionizada, Tampão de Reacção de PCR (NH<sub>4</sub>) 10x, Cloreto de Magnésio (Mg<sub>2</sub>Cl), a enzima Taq DNA polimerase (Biotaq DNA polimerase, Bioline, Londres, Reino Unido), e dideoxinucleótidos (dNTPs) (Amershan Pharmacia Biotech Inc., Reino Unido), cujas concentrações iniciais, volumes necessários e concentrações finais estão discriminados na tabela 4.

| Reagentes                 | Concentração inicial | Mistura de reacção/tubo | Concentração final (reacção) |
|---------------------------|----------------------|-------------------------|------------------------------|
| Água                      | ---                  | 8,05 µl                 | ---                          |
| Tampão (NH <sub>4</sub> ) | 10x                  | 2,5 µl                  | 1:10                         |
| dNTPs                     | 200 µM               | 2 µl                    | 4 µM                         |
| Mg <sub>2</sub> Cl        | 50 mM                | 1,25 µl                 | 2,5 mM                       |
| Primer HJ- plasmid-1      | 6,25 µM              | 1 µl                    | 0,25 µM                      |
| Primer HJ- plasmid-2      | 6,25 µM              | 1 µl                    | 0,25 µM                      |
| Primer HJ- MOMP-1         | 6,25 µM              | 1 µl                    | 0,25 µM                      |
| Primer HJ-MOMP-2          | 6,25 µM              | 1 µl                    | 0,25 µM                      |
| Primer CI-Reverse         | 2,5 µM               | 1 µl                    | 0,1 µM                       |
| Primer CI-Forward         | 2,5 µM               | 1 µl                    | 0,1 µM                       |
| Taq (BIotaq)              | 5 U/ µl              | 1 µl                    | 0,04 U/ µl                   |
| Volume total              | ---                  | 20 µl                   | ---                          |

**Tabela 4:** Volumes e concentrações necessárias para preparar a mistura de reacção da técnica de PCR *multiplex*

### 2.5.1.3- Reacção de PCR

Para a reacção de amplificação, os tubos contendo a mistura de reacção foram identificados com o respectivo número da amostra, sendo-lhes adicionado 5 µl do respectivo ADN, depois de executado um *spin down* para evitar contaminações cruzadas.

Utilizaram-se também três tubos para controlos negativos, um para controlo positivo e um para controlo interno. Aos tubos destinados aos controlos negativos adicionou-se 5µl de água bidestilada desionizada, tendo havido o cuidado de processar um no início, um a meio e outro no final de todo o processo. Ao tubo para controlo positivo adicionou-se 2,5 µl de ADN de *C. trachomatis* serovar L2 extraído de cultura de células McCoy, cedido pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, (diluído a 1:10 em TAE) e 2,5 µl de água.

As reacções de amplificação foram efectuadas no termociclador *Biometra T personal* com as condições de amplificação descritas na tabela 5.

| Ciclos    | Temperatura em graus centígrados | Duração em minutos |
|-----------|----------------------------------|--------------------|
| 1º Ciclo  | 95                               | 0,5                |
| 40 Ciclos | 95                               | 0,5                |
|           | 60                               | 1                  |
|           | 72                               | 1                  |
| 1 Ciclo   | 72                               | 8                  |
| 1 Ciclo   | 4                                | ∞                  |

**Tabela 5:** Condições de amplificação da técnica de PCR *multiplex* para pesquisa de ADN de *C. trachomatis*

#### 2.5.1.4- Electroforese

Com o objectivo de visualizar as bandas dos produtos amplificados pela técnica de PCR, efectuou-se a análise electroforética. Para tal, preparou-se um gel de agarose a 1,5% (Agarose Multipropose, Bioline, Reino Unido) em tampão etilodiaminatetracético (TBE) numa diluição de 1:10 (pH 8,3) (National Diagnostics, Reino Unido), ao qual depois de frio, sem solidificar, se acrescentou Brometo de Etídeo (0,5 µg/ml) numa proporção de 5µl por 100 ml de gel. Deixou-se solidificar numa câmara própria para o efeito. Para a electroforese misturou-se 10 µl de cada produto amplificado com 3µl de tampão amostra (Solução saturada de Sacarose com azul de Bromofenol) e aplicou-se nos poços do gel. Em cada corrida foi incluído um controlo positivo, um controlo negativo e um marcador de peso molecular HyperLadder II (BIOLINE, Londres, Reino Unido), este último para identificação do tamanho dos fragmentos amplificados. O gel foi em seguida submetido a um campo eléctrico de 100 Volts e 50 Amperes durante cerca de uma hora.

A visualização dos produtos amplificados foi feita através de fluorescência por UV, no equipamento GEL DOC<sup>®</sup> XR (BIO-RAD, Reino Unido), com o programa informático Quantity One (figura 6).

Considerou-se como um resultado positivo para a presença de infecção por *C. trachomatis* a visualização de uma banda de 148 pb, resultante da amplificação de um fragmento do plasmídeo críptico, e de uma banda de 218 pb, resultante da amplificação de um fragmento do gene *omp1*. Quando apenas foi visualizada uma destas bandas, o resultado foi considerado duvidoso e a amostra foi repetida com a mesma técnica. Todas as amostras que apresentaram amplificação em uma ou nas duas bandas foram estudadas por *nested* PCR, para confirmação de resultados. Em qualquer amostra em que não se tenha observado amplificação do fragmento de 100pb resultante da amplificação do controlo interno, foi considerado que a amplificação tinha sido inibida, e por isso extraída por outra técnica.

## 2.5.2- Técnica de PCR *multiplex* em tempo real

A técnica de PCR *multiplex* em tempo real utilizada neste estudo baseou-se na já referida técnica descrita por Jalal *et al.* (2006, b), variando apenas no que se relaciona com as sondas.

### 2.5.2.1- Descrição dos primers e das sondas

Os três pares de primers utilizados foram os descritos em 2.5.1.1, estando as suas sequências descritas na tabela 3, e as sequências amplificadas nas figuras 4 e 5.

A identificação dos produtos amplificados foi efectuada com sondas oligonucleotídicas (TaqMan) seleccionadas e sintetizadas por QUILABAN (TIB<sup>®</sup> MOLBIOL, Berlim, Alemanha), com a seguinte composição:

Sonda para o Controlo Interno- Cy5 (Cy5-CI): 5' Cy5- ATT GTG TGG GTG TGG TGT GGG TGT GTG C--BBQ

Sonda para o *omp1*- JOE (JOE-MOMP): 5' YAK- ATG TTT ACV AAY GCY GCT T-- BBQ

Sonda para o plasmídeo críptico- ROX (ROX-PL): 5' ROX- CGA ACT CAT CGG CGA TAA GG--BBQ

### 2.5.2.2- Preparação da mistura de reacção

A mistura de reacção da técnica de PCR foi realizada com água bidestilada desionizada, primers HJ- plasmid-1 e 2 e HJ- MOMP-1 e 2, a 0,125 µM, e CI-Reverse e Forward, a 0,1 µM, as sondas

Cristina Isabel dos Santos Paixão Lobato

ROX-PL e JOE-MOMP foram utilizadas numa concentração final de 0,2  $\mu\text{M}$ , a sonda Cy5-CI com concentração final de 0,1  $\mu\text{M}$ , enzima (FailSafe Enzyme Blend, Epicentre Biotechnologies, USA) e pré-mix Probe 3 (FailSafe Probes Real-Time PCR, Epicentre Biotechnologies, USA). Na tabela 6 estão discriminadas todas as concentrações iniciais, volumes necessários e concentrações finais.

| Reagentes            | Concentração inicial | Mistura de reacção/tubo | Concentração final (reacção) |
|----------------------|----------------------|-------------------------|------------------------------|
| Água                 | ---                  | 1,62 $\mu\text{l}$      | ---                          |
| Primer HJ- plasmid-1 | 6,25 $\mu\text{M}$   | 0,36 $\mu\text{l}$      | 0,125 $\mu\text{M}$          |
| Primer HJ- plasmid-2 | 6,25 $\mu\text{M}$   | 0,36 $\mu\text{l}$      | 0,125 $\mu\text{M}$          |
| Primer HJ- MOMP-1    | 6,25 $\mu\text{M}$   | 0,36 $\mu\text{l}$      | 0,125 $\mu\text{M}$          |
| Primer HJ-MOMP-2     | 6,25 $\mu\text{M}$   | 0,36 $\mu\text{l}$      | 0,125 $\mu\text{M}$          |
| Primer CI-Reverse    | 5 $\mu\text{M}$      | 0,36 $\mu\text{l}$      | 0,1 $\mu\text{M}$            |
| Primer CI-Forward    | 5 $\mu\text{M}$      | 0,36 $\mu\text{l}$      | 0,1 $\mu\text{M}$            |
| ROX                  | 10 $\mu\text{M}$     | 0,36 $\mu\text{l}$      | 0,2 $\mu\text{M}$            |
| Cy5                  | 5 $\mu\text{M}$      | 0,36 $\mu\text{l}$      | 0,1 $\mu\text{M}$            |
| JOE                  | 10 $\mu\text{M}$     | 0,18 $\mu\text{l}$      | 0,2 $\mu\text{M}$            |
| Enzima               | ---                  | 0,72 $\mu\text{l}$      | ---                          |
| Pré-mix 3            | ---                  | 9 $\mu\text{l}$         | ---                          |

**Tabela 6:** Volumes e concentrações necessárias para preparar a mistura de reacção para técnica de PCR *multiplex* em tempo real para a pesquisa de ADN de *C. trachomatis*

### 2.5.2.3- Reacção de PCR

Para a reacção de amplificação, os tubos contendo a mistura de reacção foram identificados com o respectivo número da amostra, sendo-lhes adicionado 3,6  $\mu\text{l}$  do respectivo ADN, depois de executado um *spin down* para evitar contaminações cruzadas.

Utilizaram-se também três tubos para controlos negativos, um para controlo positivo e um para controlo interno. Aos tubos destinados aos controlos negativos adicionou-se 3,6 µl de água bidestilada desionizada, tendo-se o cuidado de processar um no início, um a meio e outro no final de todo o processo. Ao tubo para controlo positivo adicionou-se 2,5 µl de ADN de *C. trachomatis* serovar L2 (diluído a 1:10 em TAE) e 1,1 µl de água.

As reacções de amplificação foram efectuadas no RotorGene™3000 (Corbett Research) e as condições de amplificação estão descritas na tabela 7.

No computador ligado ao RotorGene™3000 foi visualizada a reacção de amplificação em tempo real, e os resultados obtidos registados em três gráficos correspondentes ao sinal de cada uma das sondas (Cy5-CI, JOE-MOMP, ROX-PL)

| Ciclos    | Temperatura em graus centígrados | Duração em minutos |
|-----------|----------------------------------|--------------------|
| 1º Ciclo  | 95                               | 2                  |
| 40 Ciclos | 95                               | 0,25               |
|           | 60                               | 1                  |

**Tabela 7:** Condições de amplificação da técnica de PCR *multiplex* em tempo real para a pesquisa de ADN de *C. trachomatis*

A partir dos controlos negativos obteve-se o limiar do resultado negativo (sem amplificação). A presença de curva de amplificação no controlo positivo permitiu garantir a existência de boas condições da reacção de PCR. Considerou-se a presença de inibição da reacção de PCR sempre que não se observou amplificação (Canal Cy5-CI) do controlo interno, adicionado previamente a todas as amostras. Qualquer amostra com sinal nos canais ROX, JOE e Cy5 foi considerada positiva para a pesquisa de ADN de *C. trachomatis*, enquanto que as amostras com ausência de sinal nos dois

Cristina Isabel dos Santos Paixão Lobato



primeiros canais acompanhada por amplificação no canal Cy5 foram consideradas negativas para a pesquisa de ADN de *C. trachomatis*.

### 2.5.3- Técnica de *nested* PCR

Todas as amostras com resultado positivo ou duvidoso em qualquer das técnicas referidas anteriormente foram estudadas por uma técnica de *nested* PCR com os objectivos de confirmação de resultados e posterior sequenciação.

A técnica de PCR executada foi adaptada das descritas por Yan *et al.*, 1993, e Caldwell *et al.*, 2003. Consistiu numa primeira amplificação (*outer* PCR) que tem como alvo um fragmento do gene *omp1*, seguida de uma segunda amplificação (*inner* PCR) de um fragmento do produto da primeira amplificação.

#### 2.5.3.1- *Outer*- PCR

##### 2.5.3.1.1- Descrição dos primers

Os primers utilizados têm a seguinte sequência: Forward- OMP1 5' GCC GCT TTG AGT TCT GCT TCC TC 3'; e Reverse- OMP2 5' ATT TAC GTG AGC AGC TCT CTC AT 3'.

O fragmento amplificado com este par de primers tem um comprimento de 1142 pb e a sequência está descrita na figura 6.

**C.trachomatis (Da/TW-448) omp1 gene for major outer membrane protein**

LOCUS X62921 1325 bp DNA linear BCT 25-JUL-1993  
 DEFINITION C.trachomatis (Da/TW-448) omp1 gene for major outer membrane protein.  
 ACCESSION X62921 S45921  
 VERSION X62921.1 GI:40718  
 SOURCE Chlamydia trachomatis  
 ORGANISM [Chlamydia trachomatis](#)  
 Bacteria; Chlamydiae; Chlamydiales; Chlamydiaceae; Chlamydia.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1325)  
 AUTHORS Sayada,C., Denamur,E. and Elion,J.  
 TITLE Complete sequence of the major outer membrane protein-encoding gene of Chlamydia trachomatis serovar Da  
 JOURNAL Gene 120 (1), 129-130 (1992)  
 PUBMED [1398119](#)  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1325)  
 AUTHORS Denamur,E.  
 ORIGIN

```

1  ttcctcaggc cattaattgc tacaggacat cttgtctggc ttttaactagg acgcagtgcc
61  gccagaaaaa gatagcgagc acaaagagag ctaattatac aatccttagag gtaagaatga
121 aaaaactctt gaaatcggtt ttagtatttg ccgctttgag ttctgcttcc tccttgcaag
181 ctctgcctgt ggggaatcct gctgaaccaa gccttatgat cgacggaatt ctgtgggaag
241 gtttcggttg agatccttgc gatccttgca ccacttggtg tgacgctatc agcatgcgta
301 tgggttacta tggagacttt gttttcgacc gtgttttgga aacagatgtg aataaagaat
361 tccacatggg tgccaagcct acaactgata caggcaatag tgcagctcca tccactctta
421 cagcaagaga gaatcctgct tacggccgac atatgcagga tgctgagatg tttacaaatg
481 ccgcttgcat ggcattgaat atttgggagc gttttgatgt attctgtaca ttaggagcca
541 ccagtggata tcttaaagga aactctgctt ctttcaattt agttggattg tttggagata
601 atgaaaatca aaaaacggtc aaagcggagt ctgtaccaaa tatgagcttt gatcaatctg
661 ttgttgagtt gtatacagat actacttttg cgtggagcgt cggcgctcgc gcagctttgt
721 gggaatgtgg atgtgcaact ttaggagcct cattccaata tgctcaatct aaacctaaag
781 tagaagaatt aaacgttctc tgcaatgcag cagagtttac tattaataaa cctaaagggg
841 atgtaggtaa ggagtttctt cttgatctta cagcaggaac agatgctgcg acaggaacta
901 aggatgcctc tattgattac catgaatggc aagcaagttt agctctctct tacagactga
961 atatgttcac tccctacatt ggagttaaat ggtctcgagc aagctttgat gccgatacga
1021 ttcgtatagc ccagccaaaa tcagctacag ctatctttga tactaccacg cttaacccaa
1081 ctattgctgg agctggcgat gtgaaaactg gcacagaggg tcagctcgga gacacaatgc
1141 aaatcgtttc cttgcaattg aacaagatga aatctagaaa atcttgcggt attgcagtag
1201 gaacaactat tgtggatgca gacaaatacg cagttacagt tgagactcgc ttgatcgatg
1261 agagagcagc tcacgtaaat gcacaattcc gcttctaata attgtataat tatattagga
1321 tctttt

```

**Figura 6:** Fragmento do gene *omp1* amplificado pela técnica de *nested* PCR para pesquisa de ADN de *C. trachomatis*.

A verde o *Forward primer* e a azul o *Reverse primer* da *outer* PCR, delimitam o fragmento de 1142 amplificado. A laranja o *Forward primer* e a vermelho o *Reverse primer* da *inner* PCR, delimitam o fragmento de 879 amplificado.

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X62921.1>

## 2.5.3.1.2- Preparação da mistura de reacção

Na preparação das misturas de reacção da técnica de *outer* PCR utilizaram-se os primers CT1 e CT5, água bidestilada desionizada, Tampão de Reacção de PCR (NH<sub>4</sub>) 10x, Cloreto de Magnésio

(Mg<sub>2</sub>Cl), a enzima Taq DNA polimerase (Biotaq DNA polimerase, Bioline, Londres, Reino Unido), e dideoxinucleótidos (dNTPs) (Amershan Pharmacia Biotech Inc., Reino Unido), cujas concentrações iniciais, volumes necessários e concentrações finais estão discriminados na tabela 8.

| Reagentes                 | Concentração inicial | Mistura de reacção/tubo | Concentração final (reacção) |
|---------------------------|----------------------|-------------------------|------------------------------|
| Água                      | ---                  | 14,45 µl                | ---                          |
| Tampão (NH <sub>4</sub> ) | 10x                  | 2,5 µl                  | 1x                           |
| dNTPs                     | 200 µM               | 1 µl                    | 10 µM                        |
| Mg <sub>2</sub> Cl        | 50 mM                | 0,75 µl                 | 1,5 mM                       |
| Primer OMP-1              | 25 µM                | 0,5 µl                  | 0,5 mM                       |
| Primer OMP-2              | 25 µM                | 0,5 µl                  | 0,5 mM                       |
| Taq (BIotaq)              | 2,5 U/ µl            | 0,3 µl                  | 0,25 U/ µl                   |

**Tabela 8:** Volumes e concentrações necessárias para preparar a mistura de reacção para a *outer* PCR para a pesquisa de ADN de *C. trachomatis*

#### 2.5.3.1.3- Reacção de PCR

O número de tubos que se identificou com mistura de reacção de PCR foi igual ao de amostras a processar acrescentado de dois controlos negativos e um controlo positivo. Fez-se um *spin down* nos tubos contendo as amostras com resultado positivo pelas técnicas de PCR *multiplex* e/ou na PCR *multiplex* em tempo real para evitar contaminações cruzadas. Adicionou-se 2 µl de água a um dos tubos a utilizar para o controlo negativo, 2µl de cada uma das amostras a amplificar, 2 µl de ADN de *C. trachomatis* serovar L2 (diluído a 1:10 em TAE) e 2 µl de água ao tubo destinado ao segundo controlo negativo.

Para a amplificação *outer* utilizou-se o Termociclador Master Cycler Personal- Eppendorf, com as condições de amplificação descritas na tabela 9.

| Ciclos    | Temperatura em graus centígrados | Duração em minutos |
|-----------|----------------------------------|--------------------|
| 1º Ciclo  | 95                               | 5                  |
| 30 Ciclos | 95                               | 1,3                |
|           | 62                               | 2,3                |
|           | 72                               | 3                  |
| 1 Ciclo   | 72                               | 10                 |
| ∞         | 4                                | ∞                  |

**Tabela 9:** Condições de amplificação da técnica de *outer* PCR para a pesquisa de ADN *C. trachomatis*

### 2.5.3.2- *Inner*- PCR

#### 2.5.3.2.1- Descrição dos primers

Os primers utilizados para a segunda amplificação possuem a seguinte sequência: Forward- OMP3- 5' TGA CTT TGT TTT CGA CCG TGT TTT 3'; e Reverse-OMP4- 5' TTT TCT AGA TTT CAT CTT GTT CAA YTG 3'. O fragmento amplificado com este par de primers tem um comprimento de 879 pb, estando a sequência do referido fragmento apresentada na figura 6.

#### 2.5.3.2.2- Preparação da mistura de reacção

Na preparação das misturas de reacção da técnica de *inner* PCR utilizaram-se os primers VD1 e VD4, água bidestilada desionizada, Tampão de Reacção de PCR (NH<sub>4</sub>) 10x, Cloreto de Magnésio

(Mg<sub>2</sub>Cl), a enzima Taq DNA polimerase (Biotaq DNA polimerase, Bioline, Londres, Reino Unido), e dideoxinucleótidos (dNTPs) (Amershan Pharmacia Biotech Inc., Reino Unido), cujas concentrações iniciais, volumes necessários e concentrações finais estão discriminados na tabela 10.

| Reagentes                 | Concentração inicial | Mistura de reacção/tubo | Concentração final (reacção) |
|---------------------------|----------------------|-------------------------|------------------------------|
| Água                      | ---                  | µl                      | ---                          |
| Tampão (NH <sub>4</sub> ) | 10x                  | 5 µl                    | 1x                           |
| dNTPs                     | 200 µM               | 2 µl                    | 8 µM                         |
| Mg <sub>2</sub> Cl        | 50 mM                | 1,5 µl                  | 1,5 mM                       |
| Primer OMP-3- VD 3        | 25 µM                | 1 µl                    | 0,5 mM                       |
| Primer OMP-4-VD 4         | 25 µM                | 1 µl                    | 0,5 mM                       |
| Taq (Biotaq)              | 2,5 U/ µl            | 0,5 µl                  | 0,25 U/ µl                   |

**Tabela 10:** Volumes e concentrações necessárias para preparar a mistura de reacção para a técnica de *inner* PCR para pesquisa de ADN de *C. trachomatis*

#### 2.5.3.2.3- Reacção de PCR

Para realizar esta segunda amplificação adicionou-se a cada mistura de reacção 2 µl do produto obtido pela técnica de *outer* PCR.

Para a amplificação *inner* utilizou-se o Termociclador Master Cycler Personal- Eppendorf, com as condições de amplificação descritas na tabela 11.

| Ciclos    | Temperatura em graus centígrados | Duração em minutos |
|-----------|----------------------------------|--------------------|
| 1º Ciclo  | 95                               | 5                  |
| 40 Ciclos | 95                               | 1                  |
|           | 62                               | 1                  |
|           | 72                               | 1                  |
| 1 Ciclo   | 72                               | 10                 |
| ∞         | 4                                | ∞                  |

**Tabela 11:** Condições de amplificação da técnica de *inner* PCR para a pesquisa de ADN *C. trachomatis*

#### 2.5.3.2.4- Electroforese

A electroforese foi realizada como descrito em 2.5.1.4. A visualização de uma banda de 879 pb no gel foi considerada como resultado positivo para a presença de infecção por *C. trachomatis*.

| Resultados                                 | Interpretação   |
|--|---|
| Banda com comprimento de 879 pb            | Presença de ADN de <i>C. trachomatis</i> na amostra em estudo |
| Ausência de bandas no gel de electroforese | Ausência de ADN de <i>C. trachomatis</i> na amostra em estudo |
| CP- Negativo                               | Resultado inválido  |
| CN- Positivo                               | Resultado inválido  |

**Tabela 12:** Algoritmo de interpretação de resultados de *inner* PCR para a pesquisa de ADN de *C. trachomatis*

#### 2.5.4- Sequenciação

Os produtos obtidos por técnica de *nested* PCR foram sequenciados em ambas as direcções (directa e reversa) pela casa comercial STAB VIDA, Investigação e Serviços em Ciências Biomédicas, Lda (Oeiras, Portugal). Posteriormente, foram analisados com o software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e comparados com a base GenBank. Para tal, as sequências complementares obtidas pela sequenciação relativas a cada amostra foram editadas e alinhadas no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Versão 7.0.9.0), para obtenção de uma sequência individual, que foi depois analisada no programa BLAST e comparada com sequências do gene *omp1* de *C. trachomatis* com genótipos conhecidos, para identificação do genótipo presente na amostra.

#### 2.6- Identificação de *N. gonorrhoeae*

A detecção de *N. gonorrhoeae* nas amostras incluídas neste estudo foi efectuada por pesquisa de ADN daquele microrganismo por técnicas de PCR e PCR em tempo real.

Em paralelo todos os exsudados endocervicais foram semeados em meio selectivo VCA 3 (BioMerieux, Lion, França) no laboratório de microbiologia do hospital Amadora Sintra, e incubadas a 37°C em atmosfera de 3-5% CO<sub>2</sub>, durante 72h e identificados através de uma técnica de API NH (BioMerieux, Lion, França).

### 2.6.1- PCR

A técnica de PCR para a pesquisa de ADN de *N. gonorrhoeae* baseou-se na descrita por HO et al., em 1992, a qual utiliza como alvo de amplificação um fragmento do gene *ccpB* do plasmídeo críptico pJD. (Ho et al., 1992)

#### 2.6.1.1- Descrição dos primers

Os primers utilizados foram fornecidos pela casa comercial Invitrogen Custom Primers- Illumina<sup>®</sup>, sendo as suas sequências as seguintes:

HO1- *Forward primer* 5' GCT ACG CAT ACC CGC GTT GC 3'

HO3- *Reverse primer* 5' CGA AGA CCT TCG AGC AGA CA 3'

O fragmento flanqueado tem um comprimento de 390 pb, cuja sequência está representada na figura 7.



**Plasmid pJD1, complete sequence**

LOCUS NC\_001377 4207 bp DNA circular BCT 06-MAY-2009  
 DEFINITION Plasmid pJD1, complete sequence.  
 ACCESSION NC\_001377  
 VERSION NC\_001377.1 GI:9507310  
 DBLINK Project: [15802](#)  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Plasmid pJD1  
 ORGANISM [Plasmid pJD1](#)  
 other sequences; plasmids.  
 REFERENCE 1 (bases 3049 to 3146)  
 AUTHORS Hagblom,P., Korch,C., Jonsson,A.B. and Normark,S.  
 TITLE Intragenic variation by site-specific recombination in the  
 cryptic plasmid of Neisseria gonorrhoeae  
 JOURNAL J. Bacteriol. 167 (1), 231-237 (1986)  
 PUBMED [3087954](#)  
 ORIGIN  
 1 ggaccactcc cgccgccttt cccctattg aaaaactgca caatcattgg gactgccatc  
 61 cgttcttttc tttggctaaa aaatcccgtg gggaatttaa ggaacgttcc aacgctgcca  
 ...  
 3061 aggctttcat cattcgctgc tcgattgctg cgtgattgct ctctaattcc gctaacgcgt  
 3121 ccagcattcg cttctcggtc **gctacgcata cccgcgttgc** tttgctgttc tcgactgggc  
 3181 aattttccag tgtcaaacct ttggtcttgg tttccaacag gtctaggggtg cgctctgctt  
 3241 cggtctcttg ctgtttcaag tcgtccagct cgttcttgac gctccatata gctatgaaca  
 3301 gccctgctat gactatcaac cctgccgccg atatacctag caagctccac agatagggct  
 3361 tgaataactgc cttgctcatg cgtaactgcc gggcgtttat atcggcgggtt attttctgct  
 3421 cgctttgctt caatgcctcg ttgatatttt tccgtaacgt ctctaagtct gctttcgttt  
 3481 gttgctctat gctggcggtt tcggtgcgtg **atgtctgctc gaaggctctt gccaaatcgg**  
 3541 aaatcttgct catacagtgc gcctttcagt cggatgttgc gcccttttgg gtccgggttc  
 //

**Figura 7:** Fragmento amplificado do gene *ccpB*. A vermelho o *Forward primer* e a laranja o *Reverse primer*, delimitam um fragmento de 390 pb. Fonte: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_001377](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001377)

### 2.6.1.2- Preparação da mistura de reacção

A mistura da reacção de PCR foi feita com os primers supra mencionados, água bidestilada desionizada, Tampão de Reacção (NH<sub>4</sub>) 10x, dNTPs, Mg<sub>2</sub>Cl e BIotaq (Bioline, Londres, Reino Unido). Na tabela 13 estão apresentadas todas as concentrações iniciais, volumes necessários e concentrações finais por reacção.

| Reagentes                 | Concentração inicial | Mistura de reacção/tubo | Concentração final (reacção) |
|---------------------------|----------------------|-------------------------|------------------------------|
| Água                      | ---                  | 12,3 µl                 | ---                          |
| Tampão (NH <sub>4</sub> ) | 10x                  | 2,5 µl                  | 1:10                         |
| dNTPs                     | 200 µM               | 2 µl                    | 4 µM                         |
| Mg <sub>2</sub> Cl        | 50 µM                | 1 µl                    | 2,5 mM                       |
| HO1                       | 12,5µM               | 1 µl                    | 0,2 µM                       |
| HO3                       | 12,5µM               | 1 µl                    | 0,2 µM                       |
| Taq (BIotaq)              | 5 U/ µl              | 0,2 µl                  | 1U                           |
| Volume total              | ---                  | 20 µl                   | ---                          |

**Tabela 13:** Volumes e concentrações necessárias para preparar as misturas de reacção para a técnica de PCR para pesquisa de ADN de *N. gonorrhoeae*

### 2.6.1.3- Reacção de PCR

Para a reacção de amplificação, os tubos contendo a mistura de reacção foram identificados com o respectivo número da amostra, sendo-lhes adicionado 5 µl do respectivo ADN, após executado um *spin down* para evitar contaminações cruzadas.

Utilizaram-se também três tubos para controlos negativos e um para controlo positivo. Aos tubos destinados aos controlos negativos adicionou-se 5µl de água bidestilada desionizada, tendo-se o cuidado de processar um no início, um a meio e outro no final de todo o processo. Ao tubo a utilizar para o controlo positivo adicionou-se 2,5 µl de ADN de *N. gonorrhoeae* da estirpe ATCC 700825 (diluído a 1:10 em TAE) e 2,5 µl de água bidestilada desionizada.

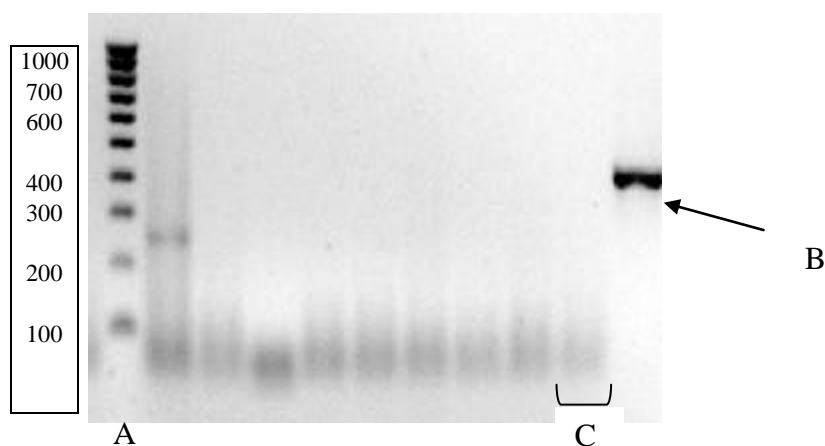
As reacções de amplificação foram efectuadas no termociclador *Biometra T personal* com as condições de amplificação descritas na tabela 14.

| Ciclos | Temperatura em graus centígrados | Duração em minutos |
|--------|----------------------------------|--------------------|
| 40     | 94                               | 0,5                |
|        | 61                               | 1                  |
|        | 74                               | 0,5                |
| ∞      | 4                                | ∞                  |

**Tabela 14:** Condições de amplificação da técnica de PCR para a pesquisa de ADN de *N. gonorrhoeae*

#### 2.6.1.4- Electroforese

A electroforese foi realizada como descrito em 2.5.1.4. A leitura do gel está descrita na figura 8.



**Figura 8:** Fotografia de gel de agarose a 1,5% para visualização dos produtos amplificados por técnica de PCR para pesquisa de ADN de *N. gonorrhoeae* em que A- Marcador de peso molecular, B- Controlo Positivo (390 pb), C- Controlo Negativo

Considerou-se como infectadas por *N. gonorrhoeae* (resultado positivo) todas as grávidas em cuja amostra foi visualizada, no gel, uma banda de 390 pb resultante da amplificação de um fragmento

do gene *ccpB* do plasmídeo críptico pJD. A ausência desta banda foi considerada como resultado negativo para a infecção acima referida.

Todos os resultados positivos foram confirmados por técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP).

## 2.6.2- PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real para pesquisa de ADN de *N. gonorrhoeae* baseou-se na descrita por Whiley *et al.* em 2004, a qual utiliza como alvo de amplificação um fragmento de 132 pb do pseudogene *porA*.

### 2.6.2.1- Descrição dos primers

Os primers utilizados foram fornecidos pela casa comercial QUILABAN (TIB<sup>®</sup>MOLBIOL, Berlim, Alemanha), com a seguinte composição:

NG-Pap- *Forward* (NG-Pap-F) *primer* 5' CGG TTT CCG TGC GTT ACG A 3'

NG- Pap-*Reverse* (NG-Pap-R) *primer* 5' CTG GTT TCA TCT GAT TAC TTT CCA 3'

A identificação dos produtos amplificados foi efectuada com uma sonda oligonucleotídica (TaqMan) seleccionada e sintetizada pela mesma casa comercial, com a seguinte composição:

Sonda- NG-Pap TM- 5- FAM- AAG TAG CAG GCG TAT AGG CGG ACTV TGC—DB

### 2.6.2.2- Preparação da mistura de reacção

A mistura de reacção da técnica de PCR foi realizada com água bidestilada desionizada, primers NG-Pap-F e NG-Pap-R, a 0,3  $\mu$ M, a sonda NG-Pap TM com concentração final de 0,1  $\mu$ M, enzima (FailSafe Enzyme Blend, Epicentre Biotechnologies, USA) e a Pré-mix Probe 6 (FailSafe Probes Real-Time PCR, Epicentre Biotechnologies, USA). Na tabela 15 estão discriminadas todas as concentrações iniciais, volumes necessários e concentrações finais de reacção.

| Reagentes   | Concentração inicial | Mistura de reacção/tubo | Concentração final (reacção) |
|-------------|----------------------|-------------------------|------------------------------|
| Água        | ---                  | 2,88 $\mu$ l            | ---                          |
| Primer NG-F | 7,5 $\mu$ M          | 0,72 $\mu$ l            | 0,3 $\mu$ M                  |
| Primer NG-R | 7,5 $\mu$ M          | 0,72 $\mu$ l            | 0,3 $\mu$ M                  |
| NG- TM      | 5 $\mu$ M            | 0,36 $\mu$ l            | 0,1 $\mu$ M                  |
| Enzima      | ---                  | 0,72 $\mu$ l            | ---                          |
| Pré-mix 6   | ---                  | 9 $\mu$ l               | 2x                           |

**Tabela 15:** Volumes e concentrações necessárias para preparar as mistura de reacção para a técnica de PCR em tempo real para pesquisa de ADN de *N. gonorrhoeae*

### 2.6.2.3- Reacção de PCR

Para a reacção de amplificação, os tubos contendo a mistura de reacção foram identificados com os números das amostras, sendo-lhes adicionado 3,6  $\mu$ l do respectivo ADN, após executado um *spin down* para evitar contaminações cruzadas.

Utilizou-se também três tubos para controlos negativos e um para controlo positivo. Aos tubos destinados aos controlos negativos adicionou-se 3 µl de água bidestilada desionizada, tendo-se o cuidado de processar um no início, um a meio e outro no final de todo o processo. Ao tubo a utilizar para o controlo positivo adicionou-se 2,5 µl de ADN de *C. trachomatis* serovar L2 (diluído a 1:10 em TAE) e 2,5 µl de água.

As reacções de amplificação foram efectuadas no RotorGene<sup>TM</sup>3000 (Corbett Research) estando as condições de amplificação descritas na tabela 16.

No computador ligado ao RotorGene<sup>TM</sup>3000 foi visualizada a reacção de amplificação em tempo real, e os resultados obtidos registados graficamente.

| Ciclos    | Temperatura em graus centígrados | Duração em minutos |
|-----------|----------------------------------|--------------------|
| 1º Ciclo  | 95                               | 2                  |
| 45 Ciclos | 95                               | 0,25               |
|           | 62                               | 1                  |

**Tabela 16:** Condições de amplificação da técnica de PCR em tempo real para a pesquisa de ADN de *N. gonorrhoeae*

### 2.6.3- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

A confirmação da especificidade dos produtos amplificados visualizados na electroforese (bandas 390 pb) foi realizada por uma técnica de RFLP, após a digestão dos mesmos com o enzima MspI (Fermentas, Porto, Portugal), segundo a técnica descrita por HO *et al.* em 1992. Segundo o mapa de restrição da endonuclease na presença do fragmento do gene *ccpB* de *N. gonorrhoeae* originam-se dois fragmentos, um de 250 pb e um de 140 pb.

Num tubo de reacção adicionou-se o tampão de enzima (1x), 5 µl do produto amplificado e 5 U do enzima MspI, de forma a obter um volume final de 20 µl. Foram também preparados tubos adicionais para efectuar um controlo positivo e um controlo negativo. Incubou-se tudo a 37°C durante 2h e posteriormente, efectuou-se uma electroforese como descrito em 2.5.1.4., para visualização dos produtos obtidos.

## IV- Resultados

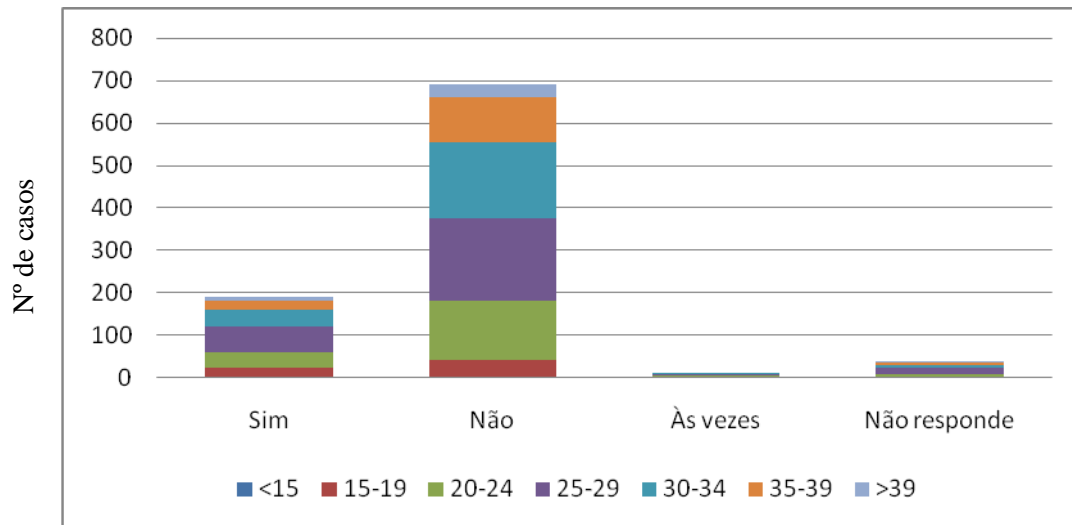
### 1- Caracterização da população

Foram testadas 1201 mulheres, assintomáticas, grávidas de 36 semanas, cuja idade variou entre os 14 e os 48 anos, situando-se a média nos  $28,8 \pm 6,2$  anos (tabela 17), e exsudados oculares de 18 recém-nascidos. Os dados sociodemográficos só foram analisados em 932 (77,6%) grávidas, uma vez que em relação às restantes não havia inquéritos disponíveis. Todas as participantes (932/1201) afirmaram encontrar-se numa relação estável e ter tido apenas um parceiro sexual nos últimos seis meses. No que diz respeito à utilização do preservativo, 73,9% (689/932) respondeu negativamente, 20,5% (191/932) respondeu que sim, 1,4% (13/932) admitiu utilizá-lo apenas ocasionalmente. Não foi possível obter esta informação relativamente a 39 (4,2%) das 932 participantes no estudo (gráfico 2). Das 932 grávidas, cinco (0,54%) estavam infectadas com o VIH1, uma (0,08%) com o VIH2, 11 (0,92%) com o vírus da hepatite B e nenhuma tinha infecção activa por *Treponema pallidum*, não tendo sido identificado nenhum caso de co-infecção entre estas.

|                     | <15  | 15-19 | 20-24 | 25-29 | 30-34 | 35-39 | >39  | Total |
|---------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| Frequência Absoluta | 2    | 84    | 246   | 342   | 308   | 167   | 52   | 1201  |
| Frequência Relativa | 0,2% | 7%    | 20,5% | 28,5% | 25,6% | 13,9% | 4,3% | 100%  |

**Tabela 17:** Distribuição das grávidas incluídas no estudo, segundo faixa etária, em frequência absoluta e relativa





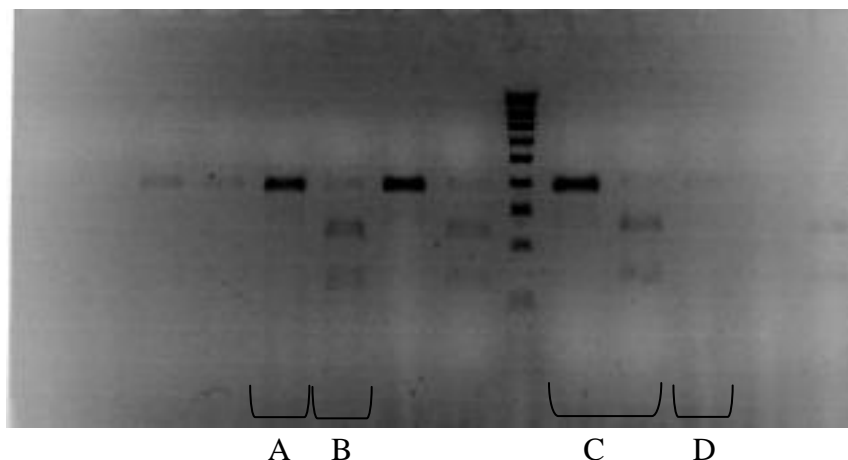
**Gráfico 2:** Gráfico em frequência absoluta da utilização de preservativo, segundo faixa etária (anos)

## 2- Pesquisa de ADN de *Neisseria gonorrhoeae*

*N. gonorrhoeae* foi identificada apenas em uma amostra. A especificidade do produto amplificado foi confirmada por uma técnica de RFLP. Na fotografia da figura 9, que corresponde a um gel de agarose efectuado de acordo com as condições referidas em material e métodos, podem visualizar-se os resultados obtidos no estudo dessa amostra: presença de uma banda na zona de 390 pb (A) correspondente ao produto amplificado pela técnica de PCR, e de duas bandas, com 250 e 140 pb (B), características da digestão do fragmento de 390 pb pela enzima de restrição MspI.

A prevalência da infecção por *N. gonorrhoeae* na população das grávidas em estudo foi de 0,08% (1/1201).

Não foi identificado ADN de *N. gonorrhoeae* em nenhum dos 18 exsudados oculares dos recém-nascidos de mães infectadas por *C. trachomatis*.

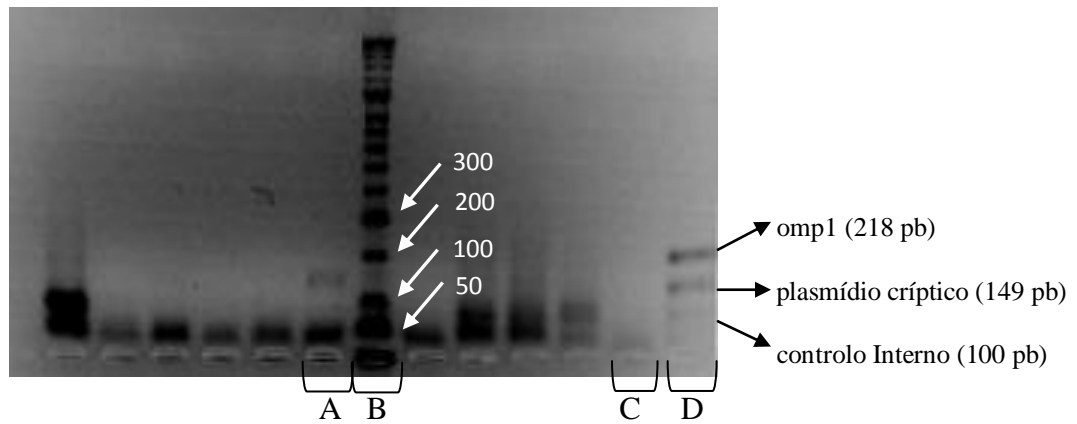


**Figura 9:** Fotografia do gel de agarose 1,5% após a electroforese dos produtos amplificados pela técnica de PCR para pesquisa de ADN de *N. gonorrhoeae* e da digestão do fragmento obtido pela enzima de restrição MspI. A- Amostra positiva após PCR (banda de 390 pb); B- A mesma amostra após digestão enzimática (duas bandas de 240 e 150 pb); C- Controlo positivo; D- Controlo negativo

### 3- Pesquisa de ADN de *Chlamydia trachomatis*

A técnica de PCR *multiplex* utilizada identificou ADN de *C. trachomatis* em 40/1201 amostras (tabela 18). Em 31/40 houve amplificação do fragmento do gene *omp1* e do plasmídeo críptico e em nove (9/40) apenas foi visível a amplificação correspondente ao plasmídeo críptico (figura 10). Não foi registada qualquer amplificação dos fragmentos alvo em 1161/1201 amostras, tendo estas sido consideradas não infectadas por *C. trachomatis*.

Não foi identificado ADN de *C. trachomatis* em nenhum dos 18 exsudados oculares dos recém-nascidos de mães anteriormente diagnosticadas com infecção por *C. trachomatis*.



**Figura 10:** Fotografia de gel de agarose a 1,5% após electroforese para a visualização dos produtos amplificados por técnica de PCR *multiplex* para identificação de *C. trachomatis*. A- Amostra positiva; B- Marcador de peso molecular, C- Controlo Positivo, D- Controlo Negativo

Após a primeira extracção, com o kit comercial JETQUICK® Blood & Cell Culture DNA Spin Kit (Genomed, Löhne, Alemanha), 35/1201 amostras revelaram inibição ao nível da amplificação (tabela 19), tendo estas inibições sido eliminadas após congelação a -80°C e com recurso aos kits de extracção alternativos mencionados na secção “Materiais e Métodos”.

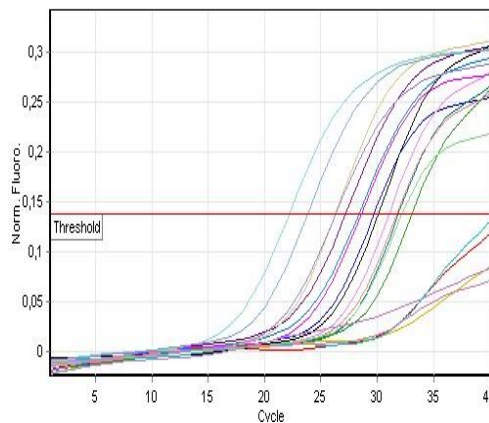
| PCR <i>multiplex</i> | PCR <i>multiplex</i> em tempo real |          |
|----------------------|------------------------------------|----------|
|                      | Positiva                           | Negativa |
| Positiva             | 31                                 | 9        |
| Negativa             | 17                                 | 1147     |

**Tabela 18:** Concordância entre as técnicas de PCR *multiplex* e de PCR *multiplex* em tempo real

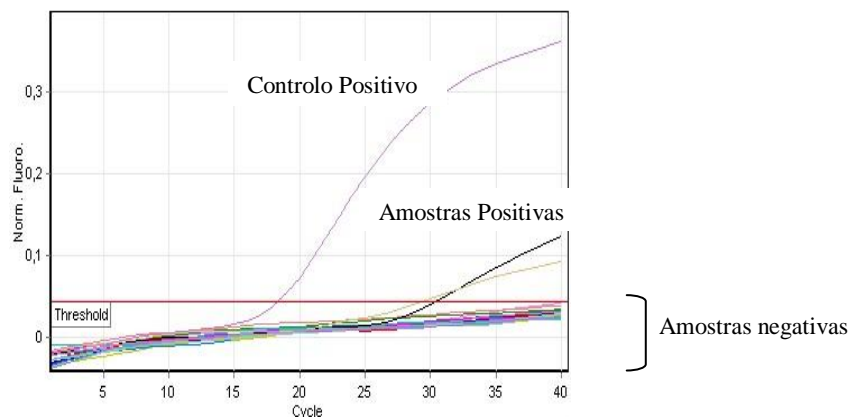
A técnica de PCR *multiplex* em tempo real utilizada identificou ADN de *C. trachomatis* em 48 amostras (tabela 18).

Em dez destas amostras positivas só se registou sinal de amplificação nos canais ROX (gráfico 5) e Cy5 (gráfico 3). Nas restantes, o sinal de fluorescência correspondente à amplificação foi obtido nos três canais (gráficos 3, 4 e 5).

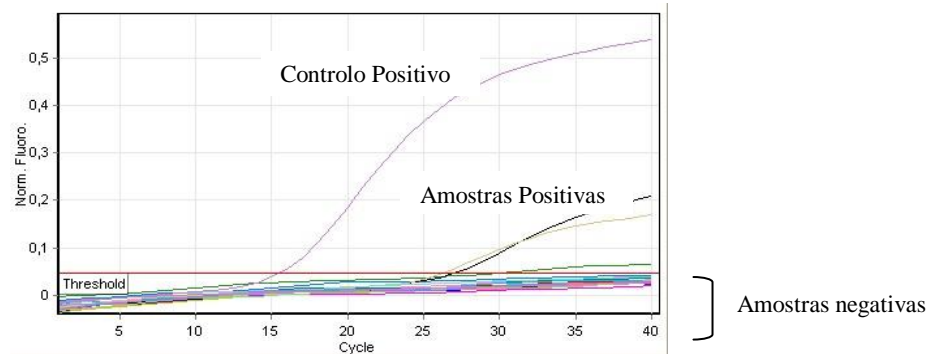
Não foi identificado ADN de *C. trachomatis* em nenhum dos exsudados oculares dos recém-nascidos (0/18).



**Gráfico 3:** Emissão de fluorescência pelos produtos amplificados no canal do Controlo Interno pela técnica de PCR *multiplex* em tempo real para pesquisa de ADN de *C. trachomatis*.



**Gráfico 4:** Emissão de fluorescência pelos produtos amplificados no canal MOMP pela técnica de PCR *multiplex* em tempo real para pesquisa de ADN de *C. trachomatis*. Cor roxa (■) - Controlo positivo; Cor verde (■) - Controlo Negativo; Cor preta (■) - amostra positiva; Cor bege (■) - amostra positiva



**Gráfico 5:** Emissão de fluorescência pelos produtos amplificados no canal do plasmídio críptico pela técnica de PCR *multiplex* em tempo real para pesquisa de ADN de *C. trachomatis*. Cor roxa (■) - Controlo positivo; Cor verde (■) - Controlo Negativo; Cor preta (■) - amostra positiva; Cor bege (■) amostra positiva

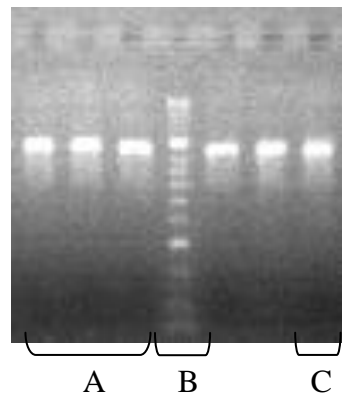
Foram obtidas, após a primeira extracção, 11/1201 amostras inibidas (tabela 19), mas em todos os casos a inibição foi eliminada após congelação a -80°C e recorrendo aos kits de extracção mencionados em “Materiais e Métodos”. Após este procedimento todas as 11 amostras foram confirmadas como negativas.

|                      |             | PCR <i>multiplex</i> em tempo real |             |
|----------------------|-------------|------------------------------------|-------------|
|                      |             | Inibida                            | Não Inibida |
| PCR <i>multiplex</i> | Inibida     | 2                                  | 33          |
|                      | Não Inibida | 9                                  | 1157        |

**Tabela 19:** Comparação da inibição registada ao nível da amplificação nas técnicas de PCR *multiplex* e de PCR *multiplex* em tempo real

#### 4- Pesquisa de ADN de *C. trachomatis* por técnica de *nested* PCR

As 40 amostras em que se registou amplificação pela técnica de PCR *multiplex*, foram testadas por *nested* PCR (figura 11), tendo sido confirmada a presença de ADN de *C. trachomatis* apenas em 31 amostras (tabela 20) as quais foram consideradas definitivamente como positivas. Em nove amostras (9/40) não se visualizou qualquer amplificação por técnica de *nested* PCR, sendo estes resultados considerados falsos positivos. Importa referir que estas nove amostras quando testadas pela técnica de PCR *multiplex* em tempo real, também não produziram qualquer fluorescência característica de amplificação.



**Figura 11:** Fotografia de gel de agarose a 1,5% após electroforese dos produtos amplificados por técnica de *inner* PCR.

A- Amostras Positivas; B- Marcador de peso Molecular; C- Controlo Positivo.

| <i>nested</i> PCR | PCR <i>multiplex</i> |          | PCR <i>multiplex</i> em tempo real |          |
|-------------------|----------------------|----------|------------------------------------|----------|
|                   | Positiva             | Negativa | Positiva                           | Negativa |
| Positiva          | 31                   | 14       | 45                                 | 0        |
| Negativa          | 9                    | 3        | 3                                  | 8        |

**Tabela 20:** Comparação entre os resultados obtidos com a técnica de PCR *multiplex* (n=40) e a de PCR *multiplex* em tempo real (n=48), segundo os resultados por *nested* PCR

O mesmo procedimento foi realizado com as 48/1201 amostras que revelaram amplificação na técnica de PCR *multiplex* em tempo real. Em 45/48 o resultado foi confirmado (tabela 20), enquanto que nas restantes (3/48) tal não aconteceu.

Todas as amostras com resultados de falsa positividade pela técnica de PCR *multiplex* em tempo real, foram negativas pela técnica de PCR *multiplex*.

Uma vez que utilizámos uma técnica de *nested* PCR para confirmação de todos os resultados positivos, e considerámos como amostras positivas para a presença de ADN de *C. trachomatis* aquelas que resultaram em amplificação em duas das três técnicas utilizadas, considerámos que foram obtidos 45 verdadeiros positivos na amostra em estudo, que equivale a uma prevalência de 3,7% para a infecção por *C. trachomatis* entre as mulheres grávidas de 36 semanas.

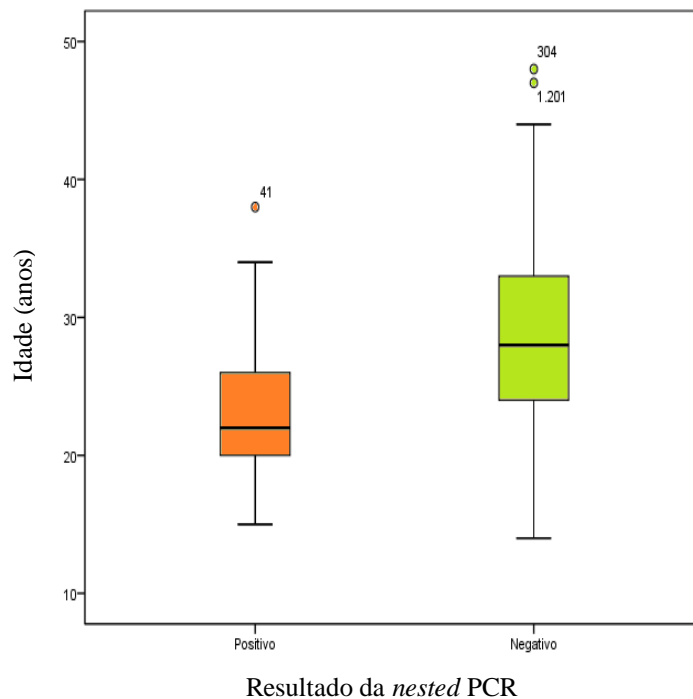
Como ilustra a tabela 20, na técnica de PCR *multiplex*, não se registou amplificação em 14 das amostras confirmadamente positivas para a presença de ADN de *C. trachomatis*, considerados falsos negativos. Destes, 5/14 pertenciam ao serovar G. Esta técnica apenas detectou dois dos sete (tabela 22) casos de infecção por este serovar, sendo que num deles a amplificação ficou perto do limiar de detecção.

Analisando a distribuição dos resultados positivos pela nossa população verificamos que o grupo com maior prevalência corresponde ao das grávidas com idade igual ou inferior a 19 anos, 11,6%, sendo que, a faixa etária dos 15 aos 25 anos ainda regista uma prevalência bastante elevada, com cerca de 8,3% (tabela 21), compreendendo 71,1% (32/45) dos casos de infecção detectados no presente estudo. Abaixo dos 15 anos de idade e acima dos 39 não foi identificado qualquer caso de infecção por *C. trachomatis*.

|                         | <15 | 15-17 | 18-25 | 26-29 | 30-34 | 35-39 | >39 | Total |
|-------------------------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-------|
| Número de casos (n)     | 0   | 2     | 30    | 5     | 7     | 1     | 0   | 45    |
| Número de casos (%)     | 0   | 4,4   | 66,7  | 11,1  | 15,6  | 2,2   | 0   | 100   |
| Número de participantes | 2   | 24    | 364   | 284   | 308   | 167   | 52  | 1201  |
| Taxa de prevalência (%) | 0   | 8,3   | 8,2   | 1,8   | 2,3   | 0,6   | 0   | --    |

**Tabela 21:** Número de casos, absoluto e em percentual, de infecção por *C. trachomatis* segundo faixa etária

Assim, no grupo das grávidas em que foi diagnosticada a infecção por *C.trachomatis* a média de idades foi de 23,56 anos, com um desvio padrão de 5,34 anos, sendo que 50% das mulheres infectadas tinham idade igual ou inferior a 22 anos. No grupo das grávidas não infectadas a média de idade foi de 28,76 anos, com um desvio padrão de 6,11 anos (gráfico 6).



**Gráfico 6:** Gráfico de caixas e bigodes para a idade em anos e infecção por *C. trachomatis*



## 5- Genotipagem

A identificação dos serovares de *C. trachomatis* foi efectuada através de sequenciação do fragmento do gene *omp1* amplificado pela técnica de *nested* PCR. O serovar mais prevalente foi o E, identificado em 31,1% das amostras positivas, seguido do G (15,6%), do D/Da (13,3%), o F, I/Ia e o J, com uma prevalência de 11,1% cada. O serovar K foi identificado em apenas 4,4% das amostras positivas e o H em 2,2% (tabela 22).

|                        | D/Da   | E       | F      | G      | H     | I/Ia   | J      | K     |
|------------------------|--------|---------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|
| <15                    | 0      | 0       | 0      | 0      | 0     | 0      | 0      | 0     |
| 15-19                  | 0      | 6       | 1      | 0      | 1     | 1      | 0      | 1     |
| 20-24                  | 2      | 3       | 3      | 4      | 0     | 4      | 4      | 0     |
| 25-29                  | 2      | 3       | 0      | 0      | 0     | 0      | 1      | 1     |
| 30-34                  | 2      | 1       | 1      | 3      | 0     | 0      | 0      | 0     |
| 35-39                  | 0      | 1       | 0      | 0      | 0     | 0      | 0      | 0     |
| >39                    | 0      | 0       | 0      | 0      | 0     | 0      | 0      | 0     |
| Número de casos (n/ %) | 6/13,3 | 14/31,1 | 5/11,1 | 7/15,6 | 1/2,2 | 5/11,1 | 5/11,1 | 2/4,4 |

**Tabela 22:** Prevalência dos serovares de *C. trachomatis* segundo faixa etária, em número absoluto e percentagem

## V- Discussão e Conclusões

A idade das participantes do presente estudo variou entre os 14 e os 48 anos, cobrindo a faixa etária de maior risco (15-25 anos), e estendendo-se até ao final da idade fértil, o que proporciona uma perspectiva abrangente da infecção por *Chlamydia trachomatis* entre mulheres grávidas (ECDC, 2008; CDC, 2006). A média das idades das grávidas que integraram o estudo foi de  $28,8 \pm 6,2$  anos, a qual é bastante semelhante à de outros estudos realizados na Bulgária, Finlândia, Espanha e Reino Unido (Wilson *et al.*, 2002). No entanto, na Suécia, diversos autores optaram por seleccionar uma população mais nova, com idades entre os 12 e os 25, restringindo-se assim apenas aos principais grupos de risco (Persson *et al.*, 1991, e Svensson *et al.*, 1994, citados por Wilson *et al.*, 2002).

No presente estudo, todas as participantes admitiram ter tido apenas um parceiro sexual nos últimos seis meses. Apesar de realizados com populações diferentes, estas respostas estão de acordo com os estudos realizados em Lisboa por Brito e Sá *et al.*, com mulheres sexualmente activas com menos de 30 anos de idade, em que 95% dos participantes admitiram ter tido apenas um parceiro sexual nos três meses anteriores (Brito de Sá *et al.*, 2002), e por Borges da Costa em adolescentes (grávidas e não grávidas), em que 76% tinham tido apenas um parceiro sexual nos doze meses anteriores (Borges da Costa, 2009). No estudo realizado por Magalhães, o período utilizado para a avaliação do número de parceiros sexuais foi o mesmo do presente estudo (seis meses) e, apesar da percentagem de indivíduos que afirmou ter tido apenas um parceiro sexual ter sido menor, constituiu a maioria da população estudada (69,4%) (Magalhães, 2010). Este último foi realizado em estudantes universitários (homens e mulheres), a maioria dos quais não se encontrava sequer numa relação estável (98,4%), o oposto do que se passou no grupo de grávidas incluídas no presente trabalho. Os autores de um estudo realizado na Grécia em mulheres assintomáticas sexualmente

activas concluíram que, quando estas tinham tido quatro ou mais parceiros sexuais o risco de contrair infecção por *C. trachomatis* era significativamente superior (Bontis *et al.*, 1994). A conclusão semelhante chegaram autores lituanos, que efectuaram uma extensa revisão da literatura, incluindo estudos realizados em mulheres grávidas e não grávidas, de vários países europeus. Estes encontraram uma forte associação entre a mudança frequente de parceiro sexual e uma probabilidade superior de contrair esta mesma infecção em ambos os grupos (Kučinskienė *et al.*, 2006).

Não foram encontrados outros estudos em que, como no nosso, 100% das participantes afirmassem ter tido apenas um parceiro sexual nos seis meses anteriores, uma vez que esta é uma questão que frequentemente fica por avaliar em estudos que envolvem grávidas, como nos efectuados por Skjeldestad *et al.* em 1997, por Nyári *et al.* em 1998 e por Ikehata *et al.* em 2000, já que na sua maioria são mulheres com relações estáveis e com menos parceiros sexuais. No entanto, Bilardi e colegas avaliaram o comportamento sexual de 100 mulheres grávidas nos doze meses anteriores, sendo que 13% tinha tido um novo parceiro sexual, e 20% tinham tido dois ou mais parceiros sexuais, estando este facto associado uma vez mais a uma maior prevalência da infecção por *C. trachomatis*. Os autores verificaram ainda que a probabilidade de estar infectada era maior nos grupos de grávidas com menos de vinte anos, que tinham trocado de parceiro sexual nos doze meses anteriores, que tinham tido dois ou mais parceiros e entre as não casadas (Bilardi *et al.*, 2010).

Na população do nosso estudo apenas 21,9% (204/932) referiu utilizar o preservativo, sendo que destas, 1,4% (13/932) mencionaram que a utilização seria apenas ocasional. Fica contudo por esclarecer se esta percentagem faz uma correcta utilização deste, pois só assim se pode afirmar que o mesmo constitui uma barreira na disseminação da infecção. Foi já estabelecida uma relação entre a não utilização, regular e correcta, do preservativo e um maior risco de contrair esta infecção

(Kučinskienė *et al.*, 2006; Brito de Sá *et al.*, 2002). No presente estudo verificou-se que 57,7% dos casos de infecção se registaram em mulheres que afirmaram não utilizar ou utilizar apenas ocasionalmente o preservativo, sendo que apenas 15,6% das infectadas confirmaram a utilização. Em relação às restantes não foi possível obter esta informação.

Devido ao número extremamente baixo de grávidas com infecção por VIH (6/932), na população em estudo não foi possível estabelecer qualquer tipo de relação com a infecção por *C. trachomatis*. Importa, no entanto, referir que nenhuma das grávidas infectadas com *C. trachomatis* e/ou *N. gonorrhoeae* possuía co-infecção com qualquer outra das patologias relatadas, incluindo o HIV.

Neste estudo, a prevalência da infecção por *C. trachomatis* e por *N. gonorrhoeae* foi de 3,7% e 0,08%, respectivamente. No grupo constituído pelos 18/45 recém-nascidos, a prevalência foi de 0% para ambas as infecções. Não foi possível estudar o exsudado ocular do único recém-nascido cuja mãe estava infectada com *N. gonorrhoeae* durante a gravidez. Contudo, naqueles em que isto foi possível, efectuou-se o rastreio para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, com vista à detecção de possíveis infecções nesses recém-nascidos, já que, embora as mães tivessem sido tratadas poderiam ter sido reinfectadas, a terapêutica poderia ter sido incorrecta ou terem, posteriormente, adquirido infecção por *N. gonorrhoeae*. Importa esclarecer que não foi possível efectuar o rastreio a 60% (27/45) dos recém-nascidos de mães infectadas, pelo que o número de casos de infecção nos recém-nascidos pode estar subestimado.

A notificação das mulheres com infecção por *C. trachomatis* ou *N. gonorrhoeae*, dos respectivos parceiros e todas as decisões terapêuticas necessárias ficaram a cargo dos Médicos Obstetras do Hospital Amadora Sintra. A sensibilização para a necessidade de serem novamente rastreadas no final da terapêutica foi também efectuada no referido Hospital. Das 45 grávidas com amostras em

que foi identificada *C. trachomatis*, apenas em 13% (6/45) foi possível obter uma segunda amostra. Apesar da fraca adesão à monitorização pós-terapêutica, as segundas amostras apresentaram uma prevalência de 0% para ambas as infecções. Esta fraca adesão pode ser explicada pelas características socioeconómicas da população servida pelo Hospital Amadora Sintra, que se caracteriza por ser tendencialmente mais carenciada, e se encontrar muitas vezes em situações bastante precárias a nível económico e familiar, com um nível de escolaridade médio-baixo, pertencente a minorias étnicas e com difícil acesso aos cuidados de saúde.

Relativamente à prevalência da infecção por *N. gonorrhoeae*, nenhum dos estudos consultados obteve uma prevalência tão baixa, situando-se esta, na maioria dos casos, entre 1% e 5% (Srifeungfung, 2009; Bernstein, 2006, Borges da Costa, 2009). Na única amostra em que foi identificada *N. gonorrhoeae* foi também identificada *C. trachomatis* serovar F, a qual era proveniente de uma primípara de 23 anos, em relação à qual não foi possível testar o recém-nascido, nem obter amostra para controlo após a terapêutica.

Quanto à taxa de prevalência da infecção por *C. trachomatis*, o valor obtido neste estudo está de acordo com as estimativas da OMS. Esta organização compilou uma série de estudos realizados em vários países europeus (Islândia, Dinamarca, Reino Unido, Hungria, Holanda, França e Itália), e situa actualmente a prevalência desta infecção em mulheres grávidas europeias entre os 2,7%, mínimo obtido na Itália, e os 8%, máximo obtido na Islândia (OMS, 2001).

Contudo, a prevalência obtida no presente estudo (3,7%) é ligeiramente inferior ao estimado pelo *European Center for Disease Control and Prevention*, que comparando os resultados de 29 países europeus a coloca entre os 5% e os 10% entre adultos sexualmente activos (ECDC, 2009), e aos

resultados obtidos por Brito de Sá *et al.*, que numa população de 1108 mulheres sexualmente activas, com idades entre os 14 e os 30 anos (média de idades 23,4±4,1 anos) da área de Lisboa, obteve uma prevalência de 4,6% (Brito de Sá *et al.*, 2002). Valores de prevalência muito semelhantes (3,9%) foram obtidos em Itália com um grupo de mulheres assintomáticas com uma média de idade de 33 anos (Italian MEGIC Group, 1993, citado por Wilson *et al.*, 2002). Apesar da média de idades ser bastante superior à do presente estudo, ambos (Brito de Sá *et al.*, 2002; Italian MEGIC Group, 1993, citado por Wilson *et al.*, 2002) foram realizados em mulheres que não apresentavam qualquer sintomatologia, sendo reservatórios potenciais para a disseminação de infecção urogenital por *C. trachomatis* aos seus parceiros sexuais, e ocular e/ou respiratória, aos seus recém-nascidos.

No entanto, se considerarmos o grupo de grávidas com idade igual ou inferior a 19 anos, a prevalência obtida no presente estudo (11,6%) está totalmente de acordo com a obtida numa população de grávidas adolescentes de um outro hospital de Lisboa, que registou uma prevalência de 11,8% para a infecção por *C. trachomatis* (Borges da Costa, 2009).

No Reino Unido e na Austrália a prevalência entre mulheres grávidas foi semelhante à obtida no presente trabalho (8,2% na faixa etária dos 15 aos 25 anos de idade). O primeiro, realizado no Reino Unido em grávidas com menos de 20 anos e o segundo, efectuado na Austrália, numa população com as mesmas características, referem prevalências na ordem dos 12,1% e 6,4%, respectivamente (Norman *et al.*, 2004 e Chen *et al.*, 2009 citados por Bilardi *et al.*, 2010).

Dos vários estudos consultados, dois apresentavam uma prevalência inferior à obtida no presente estudo. No primeiro, realizado por Magalhães, em 2010, a prevalência foi de 0%. Contudo, é difícil estabelecer comparações, já que foi utilizado um grupo populacional e uma metodologia de selecção dos participantes muito diferente. No referido estudo, a população examinada foi

constituída por universitários com uma média de idades de 21,7 anos, a selecção dos participantes não foi feita em meio hospitalar, mas sim em ambiente académico (Magalhães, 2010), facto que automaticamente faz uma selecção dos indivíduos mais informados e conscientes, como sendo aqueles com maior interesse em se voluntariar e participar no estudo. Estes factores terão provavelmente contribuído para uma tal discrepância de valores. Contudo, estão presentes factores que sendo considerados de risco poderiam contrariar esta discrepância, como o maior número de parceiros sexuais (indivíduos com apenas um parceiro sexual nos últimos seis meses- 69,4% vs 100%) e a elevada percentagem de indivíduos solteiros (98,4%).

No segundo, Thompson *et al.*, no Reino Unido, obtiveram uma prevalência de 1,7% em mulheres assintomáticas com idades compreendidas entre os 15 e os 40 anos. No entanto, este valor pode ter sido influenciado pela metodologia laboratorial utilizada, uma vez que o diagnóstico foi efectuado através de uma técnica de imunofluorescência directa (Thompson *et al.*, 1994, citado por Wilson *et al.*, 2002), a qual se sabe que apresenta tipicamente uma sensibilidade inferior às técnicas de biologia molecular utilizadas no presente estudo (Oliveira *et al.*, 2008) e em outros aqui referidos. Enquanto as técnicas de imunofluorescência directa têm revelado sensibilidades na ordem dos 75-85% no diagnóstico de infecções por *C. trachomatis* (Dean *et al.*, 2009; Schachter & Stamm, 1999), no caso dos NAAT esta ronda os 90-100% (Catry *et al.*, 1995). Segundo alguns autores, o diagnóstico através de NAAT chega a ser 20-30% mais sensível do que quando feito através de pesquisa de antígenos (Oliveira *et al.*, 2008).

No presente estudo, 71,1% dos casos de infecção por *C. trachomatis* foram registados entre os 15 e os 25 anos. Estes resultados estão de acordo com as estimativas do CDC, segundo as quais a faixa etária com maior prevalência é dos 15 aos 24 anos, seguida da dos 25 aos 39 anos. Segundo a mesma fonte em 2008, dos 1 210 523 novos casos de infecção por *C. trachomatis* notificados nos

EUA, 856 189 (70,7%) eram referentes a indivíduos com idades compreendidas entre os 15 e os 24 anos (CDC, 2010), o que originou uma prevalência semelhante à do presente estudo.

Também no estudo realizado por Skjeldestad *et al.* em grávidas norueguesas, a faixa etária dos 15 aos 24 anos, foi a que revelou maior prevalência de infecção por *C. trachomatis* com 40-50% dos resultados positivos. O estudo norueguês teve a duração de dez anos, durante os quais as faixas etárias com maior prevalência se mantiveram constantes e equivalentes à distribuição obtida no presente trabalho (Skjeldestad *et al.*, 1997). Neste estudo, 11,1% dos resultados positivos foram registados entre os 26 e os 29 anos, tendo sido registado apenas um caso de infecção (2,2%) entre os 35 e os 39 anos, e nenhum acima dos 39 anos de idade. Esta elevada prevalência nas faixas etárias mais baixas, tem sido explicada, em parte, pela imaturidade do útero até aos 25 anos de idade (Kučinskienė *et al.*, 2006), mas também por ser mais frequente a troca de parceiros sexuais e maior a percentagem de indivíduos solteiros ou em relações não estáveis. No nosso estudo, nenhum caso de infecção foi registado entre as duas participantes com idade inferior a 15 anos, o que provavelmente é consequência do reduzido número de grávidas estudadas com estas idades.

Assim e em relação à prevalência, foram identificadas grandes discrepâncias, quando faixas etárias diferentes foram analisadas separadamente. Enquanto dos 15 aos 25 a prevalência obtida foi cerca de 8,3%, na faixa dos 26-29 anos desce drasticamente para 1,8%. Por esse motivo, o rastreio das grávidas com idade até aos 25 anos, tal como recomenda o CDC (CDC, 2002), é o que melhor se adequa ao grupo de grávidas deste estudo e possivelmente a Portugal, já que com uma prevalência de 8,3% o rastreio será com certeza de custo eficaz.

No presente estudo, o serovar com uma prevalência mais elevada foi o E, identificado em 31,1% (14 casos) das amostras positivas, seguido do G com 15,6% (7 casos), do D/Da com 13,3% (6), dos F, I/Ia e J com 11,1% cada um (5), do K com 4,4% (2) e por fim o H com 2,2%, já que foi



identificado em apenas uma amostra. Esta distribuição é bastante distinta da obtida por Borrego *et al.* (1997) e por Borges da Costa (2009), tendo em comum apenas a elevada prevalência do serovar E, respectivamente, em 43,8% e 33,3% das amostras analisadas (Borrego *et al.*, 1997; Borges da Costa, 2009). O segundo serovar com maior prevalência identificado no primeiro estudo (serovar H), foi o menos prevalente no nosso estudo. Também em outros estudos, realizados em diferentes regiões do globo e com vários grupos populacionais (Takahashi *et al.*, 2007; Quint *et al.*, 2007; Bandea *et al.*, 2008; Näher *et al.*, 1991), o serovar E surge como o mais prevalente, seguido do serovar G (Takahashi *et al.*, 2007; Yamasaki *et al.*, 2005; Ikehata *et al.*, 2000; Quint *et al.*, 2007). Só no Uganda foi observada uma prevalência surpreendentemente elevada deste último serovar (45% das amostras positivas) (Quint *et al.*, 2007).

A distinção entre estirpes invasivas e não invasivas é bastante importante porque, permite a médicos e epidemiologistas determinar as abordagens terapêuticas adequadas, bem como as estratégias de intervenção e estudos para futuras vacinas (Zheng, 2006; Dean *et al.*, 2009). No nosso estudo não foi identificado nenhum dos serovares associados ao tracoma (A-C) ou ao LGV (L1-L3) e também, ao contrário do que já foi descrito por outros autores (Farencena *et al.*, 1997; Quint *et al.*, 2007), não foi identificado nenhum caso de infecção urogenital pelo serovar B.

A diferenciação dos serovares responsáveis por cada tipo de infecção tem sido bastante explorada. Alguns serovares foram já associados a uma maior ou menor intensidade de sintomas, de resposta imunológica do hospedeiro ou com a maior probabilidade de desenvolver complicações clínicas. Dean *et al.* (Dean *et al.*, 1995) identificaram uma associação entre o serovar E e infecções assintomáticas. Torna-se difícil uma extrapolação destes dados para a nossa população, visto que, apesar do serovar E ter sido o mais prevalente, todas as participantes estavam assintomáticas. Outra conclusão importante dos referidos investigadores prende-se com a identificação de uma mutação

em algumas estirpes do serovar F que poderá estar relacionada com uma maior probabilidade de desenvolvimento de doença inflamatória pélvica (Workowsky *et al.*, 1994), o que não foi verificado no presente estudo.

Não foram encontrados estudos que relacionem as várias técnicas de biologia molecular para pesquisa de *C. trachomatis* com os seus serovares. Contudo, no presente trabalho, verificou-se que, na detecção das infecções pelo serovar G, o desempenho da técnica de PCR *multiplex* foi especialmente baixo, sendo que dos sete casos de infecção por este serovar apenas detectou dois, e num deles a intensidade da amplificação foi muito fraca, ficando perto do limiar de detecção.

Em todos os 45 casos de infecção foi detectada a presença do plasmídeo críptico, independentemente da idade da grávida ou do serovar presente, ao contrário do que está descrito em outros estudos, em que foram identificadas estirpes de *C. trachomatis* sem plasmídeo críptico dos serovares L2, B e E, em exsudados uretrais (Peterson *et al.*, 1990; Farencena *et al.*, 1997; Stothard *et al.*, 1998). No entanto, a detecção do plasmídeo críptico foi dependente da técnica utilizada, uma vez que a técnica de PCR *multiplex* em tempo real o identificou em todas as amostras, enquanto que a amplificação da sequência do plasmídeo foi indetectável, após electroforese em gel de agarose, em catorze amostras com a técnica de PCR *multiplex* convencional. Esta sensibilidade superior é uma das vantagens apontadas por Oliveira *et al.*, que descreve as técnicas em tempo real como grandes mais-valias no diagnóstico rápido e preciso da infecção por *C. trachomatis* (Oliveira *et al.*, 2008).

Na amplificação do fragmento do gene *omp1*, a técnica de PCR *multiplex* teve um desempenho pouco satisfatório: em 23 amostras, a amplificação do fragmento deste gene foi demasiado fraca ou inexistente para ser observada após electroforese em gel de agarose. O mesmo aconteceu na técnica

de PCR *multiplex* em tempo real, através da qual dez amostras só emitiram fluorescência correspondente a amplificação nos canais do plasmídeo críptico e do controlo interno. Estes dados estão de acordo com as conclusões de Jalal e colegas (Jalal *et al.*, 2006 a), segundo os quais, os NAAT cujo alvo de amplificação seja o plasmídeo críptico têm uma sensibilidade superior à dos NAAT dirigidos a genes que estejam presentes em cópia única na célula. Neste estudo, uma técnica de PCR que utilizasse como alvo de amplificação apenas um fragmento do gene *omp1* não teria identificado 51,1% (23/45) casos de infecção se fosse a técnica de *multiplex* convencional, e 22,2% (10/45) no caso da técnica de PCR *multiplex* em tempo real.

No geral, foram obtidos melhores resultados com a técnica de PCR *multiplex* em tempo real do que com a técnica de PCR *multiplex*, sendo que a primeira detectou 100% dos casos positivos (45/45), enquanto que a segunda detectou apenas 68,9% (31/45). Assim, 14 amostras contendo ADN de *C. trachomatis* foram detectadas apenas pela técnica PCR *multiplex* em tempo real, não tendo sido observada qualquer amplificação na técnica de PCR *multiplex* (houve amplificação apenas do fragmento correspondente ao controlo interno). Várias justificações podem ser apontadas para explicar o desempenho desta última. A principal prende-se com o facto da leitura dos resultados na técnica de PCR *multiplex* ser feita por visualização de um gel de agarose com luz ultravioleta, o que diminui o limiar de detecção desta técnica comparativamente com a de PCR *multiplex* em tempo real. A técnica de PCR convencional também se demonstrou mais sensível a interferências intrínsecas ao tipo de amostra utilizada, a urina. Esta, tipicamente, contém menor quantidade de células, e sendo *C. trachomatis* uma bactéria intracelular obrigatória, isso reflecte-se directamente na quantidade de ADN disponível para amplificação. Há ainda a ter em conta que, mesmo em caso de infecção, nem todas as células presentes na amostra estão infectadas, o que reduz novamente o

material potencialmente amplificável. O oposto também ocorre, já que alguns autores referem que demasiada quantidade de ADN pode inibir a amplificação (Catry *et al.*, 1995). Neste caso, esta situação será muito pouco provável, dado o tipo de amostras utilizadas que, como referido atrás têm, por definição, pouco material celular. As amostras de urina são também difíceis de trabalhar, devido à presença de diversos inibidores das enzimas polimerases (Carder *et al.*, 2006; Chong *et al.*, 1996, citado por Mahony *et al.*, 1998), o que acontece essencialmente durante a gravidez, sendo este o caso da população em estudo. Apesar de tudo isto, a urina foi o produto seleccionado para o estudo, devido à facilidade na sua obtenção e pelo bom desempenho que os NAAT têm demonstrado em outros estudos que utilizaram o mesmo tipo de produto no diagnóstico de IST (Radcliffe, 2001).

Para permitir a distinção entre os casos em que a não visualização de amplificação resultou da ausência de infecção e aqueles em que foi devida a inibidores presentes na amostra foi incluído um controlo interno antes de cada ciclo de amplificação (Cribb *et al.*, 2002). Foi através dos resultados deste controlo interno que foram seleccionadas as amostras para novas extracções (todas aquelas que revelaram inibição ou resultados discrepantes entre a técnica convencional e a técnica realizada em tempo real). No total, foram 44/1201 (3,7%) as amostras em que se registou inibição a nível da amplificação, 2,9% (35/1201) na técnica de PCR *multiplex* e 0,9% (11/1201) na de PCR *multiplex* em tempo real. Estes valores são bastante inferiores aos obtidos no estudo realizado por Chong *et al.*, segundo o qual 18% das amostras de urina processadas (amostras de indivíduos do sexo feminino) continham inibidores da reacção de amplificação (Chong *et al.*, 1996, citado por Mahony *et al.*, 1998). Também Mahony *et al.*, obtiveram uma percentagem de inibição bastante superior (11,9% das amostras de grávidas e em 5,2% das não grávidas), e identificaram como principais responsáveis a presença de  $\beta$ -HCG e cristais (Mahony *et al.*, 1998).

Em todos os casos de inibição por nós estudados bastou realizar nova extracção após congelamento das urinas a -80°C para eliminar a inibição anteriormente registada. O mesmo não sucedeu no estudo realizado por Mahony e colegas, em que o armazenamento a -70°C só removeu a inibição em 84,2% dos casos. Estes utilizaram outros processos para remoção da inibição, o armazenamento a 4°C, o único método de remoção da inibição que no presente estudo foi aplicado a todas as amostras, a diluição a 1:4 e a extracção com fenol-clorofórmio. Apenas com este último os autores conseguiram eliminar a inibição em todas as amostras (Mahony *et al.*, 1998). Importa salientar que neste trabalho não foi identificada infecção por *C. trachomatis* ou *N. gonorrhoeae* em nenhuma das amostras inicialmente inibida.

Não foi possível estabelecer comparações entre os métodos de extracção, visto que, como referido acima, os kits de extracção de ADN QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini (grupo QIAGEN, IZASA Portugal) e DNA/RNA Virus Mini Kit (Invitex, Berlim, Alemanha) só foram utilizados nas amostras que inicialmente já tinham revelado inibição. Além disso, as segundas e terceiras extracções foram feitas em amostras que estavam congeladas a -80°C, o que por si só pode ter diminuído ou mesmo neutralizado os possíveis inibidores presentes na amostra durante a primeira extracção. Este procedimento, apesar de ter permitido a eliminação das inibições, não diminuiu o número de amostras com resultado falsamente negativo (14 amostras) obtidos na técnica de PCR *multiplex*.

Segundo as recomendações do CDC todos os resultados positivos foram repetidos com a mesma técnica, e na mesma amostra com uma técnica de *nested* PCR para confirmar todos os resultados positivos (CDC, 2002; Jalal *et al.*, 2006 a) e para preparação para genotipagem. Esta confirmação dos resultados positivos é indispensável por toda a carga médica, social e psicológica que uma IST acarreta.

Num outro estudo realizado por Jalal *et al.*, em que é estabelecida uma comparação entre uma técnica de PCR comercial e um ensaio imunoenzimático na detecção de infecções urogenitais por *C. trachomatis*, o desempenho da primeira foi em tudo superior ao obtido no presente estudo. Os autores desaconselharam a segunda por ter detectado apenas 80% dos resultados positivos (Jalal *et al.*, 2006 a). Se tivermos em conta que ainda assim este valor é superior aos 71,1% da técnica de PCR *multiplex* utilizada no presente estudo, temos que considerar que esta técnica não poderá ser utilizada, individualmente, para o referido diagnóstico.

Resta acrescentar que as principais limitações do presente estudo prendem-se com i) as características muito específicas da população utilizada e o tamanho da amostra, que dificilmente permitem uma extrapolação para a população em geral, ii) a selecção dos participantes não ter sido aleatória, mas sim em função dos casos disponíveis, iii) o rastreio das grávidas ter sido feito através de amostras de urina, o que foi uma opção para facilitar a adesão das grávidas assintomáticas ao estudo, iv) a fraca monitorização pós-terapêutica das mesmas quando infectadas, v) a incapacidade de rastrear todos os recém-nascidos cujas mães estavam infectadas durante a gravidez impedindo um cálculo real da prevalência destas infecções e a avaliação da eficiência do rastreio e terapêutica na prevenção da transmissão vertical.

No entanto, este estudo representa um contributo valioso para a compreensão do estado da infecção por *C. trachomatis* e por *N. gonorrhoeae* numa população portuguesa, abrindo perspectivas futuras para estudos mais específicos e noutras populações, como descrito adiante.

## **Conclusões e Perspectivas Futuras**

É facto aceite que, a morbilidade e mortalidade associadas às IST constituem um custo enorme para os sistemas de saúde e resultam numa grande diminuição da produtividade da enorme parcela de indivíduos infectados.

A infecção por *C. trachomatis* é considerada um problema de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde, pelo *Center for Disease Control and Prevention of Atlanta* e pelo *European Centre for Disease Control and Prevention*. Apesar de ser já uma infecção de notificação obrigatória em diversos países como a Alemanha, Finlândia, Luxemburgo, Reino Unido, Suécia, Grécia, Islândia, Noruega, Bélgica, entre outros (ECDC, 2008), em Portugal não existe qualquer directiva que oriente o rastreio de *C. trachomatis*, quer dirigido a grupos de risco, quer numa base oportunista, nem estudos efectuados em vários grupos populacionais que nos permitam ter uma noção generalizada da prevalência da infecção.

Assim, para que um programa de rastreio possa vir a ser instituído em Portugal e seja eficaz em termos de custo/benefício, são necessários mais estudos de prevalência em diversos grupos da população, principalmente naqueles em que se espera que os casos de infecção por *C. trachomatis* sejam em maior número. Só uma extensa avaliação do estado da infecção entre os grupos populacionais que apresentam factores de risco, e comparação com os que não apresentam estes mesmos factores, permitirá identificar os nichos mais vulneráveis a este tipo de infecções, e consequentemente os alvos prioritários no desenvolvimento de programas de rastreio.

As grávidas, pela possibilidade de sofrerem aborto, parto prematuro e pelo risco de transmissão de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* ao recém-nascido durante o parto, são claramente um alvo prioritário. Depois do presente estudo, serão necessários outros, em grávidas de regiões diferentes

do país para se conhecer se a prevalência em cada faixa etária é a mesma que aqui foi encontrada. Isto permitiria confirmar a eficácia de um programa de rastreio não só em determinado grupo etário, como no primeiro trimestre da gravidez, tal como recomendado pelo *Center for Disease Control and Prevention of Atlanta* (CDC) ( CDC, 2006), e/ou um programa de rastreio às 36 semanas. Importa referir que um programa de rastreio dirigido às mulheres no primeiro trimestre de gravidez tem grande importância na prevenção de complicações como gravidez ectópica, aborto e parto prematuro. Contudo, um rastreio tão precoce aumenta o risco de reinfeção antes do fim da gravidez e consequentemente a transmissão vertical, principalmente em populações mais resistentes a seguir indicações terapêuticas e em que a troca de parceiros sexuais é mais frequente. A vantagem de efectuar o rastreio às 36 semanas de gravidez prende-se essencialmente com a prevenção da transmissão destas duas infecções ao recém-nascido no momento do parto, o que está na origem das recomendações emitidas pelo CDC, em 1993, que determinavam que sempre que só houvesse a possibilidade de rastrear as grávidas uma vez, este deveria ser feito no último trimestre (CDC, 1993), o que se aplica à população em estudo que, pelas suas características sociais e culturais, é mais resistente e menos consciente dos cuidados pré-natais.

Neste estudo, e apesar de constar dos objectivos, não foi possível avaliar a prevalência da infecção entre os recém-nascidos, devido à fraca adesão das mães monitorizadas e ao facto da obrigatoriedade do tratamento das mães infectadas, sempre que possível. Por isso, importaria prosseguir com estudos que permitissem avaliar os factores que estiveram por trás da fraca adesão à monitorização.

Como referido acima, a técnica de PCR *multiplex* não apresentou, neste estudo, resultados compatíveis com a sua utilização como única técnica no rastreio de *C. trachomatis*, ao detectar apenas 71,1% das infecções. Contudo, será necessário estudar a utilidade desta e da técnica de PCR



*multiplex* em tempo real no diagnóstico de infecção por *C. trachomatis* em parcelas maiores da população, e com diferentes taxas de prevalência para que possa ser feita uma correcta avaliação das suas sensibilidades, especificidades, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. Impõe-se também a avaliação da técnica de *nested* PCR, enquanto substituta da cultura celular como técnica padrão.

Como referido na discussão, a distribuição epidemiológica dos serovares é bastante semelhante à obtida na maioria dos estudos consultados. Contudo, seria também importante saber se esta distribuição se mantém fora desta área geográfica e demográfica, com vista à identificação de focos e cadeias de transmissão e ao estabelecimento de associações entre serovares específicos e sintomatologias. Também os resultados obtidos em relação ao serovar G, merecem ser aprofundados, no sentido de confirmar e conseguir novas evidências no que toca ao comportamento diferencial da técnica de PCR *multiplex* no diagnóstico da infecção por este serovar.

A descoberta de uma mutação no serovar F, que poderá estar na origem de uma maior probabilidade de desenvolver doença inflamatória pélvica (Workowsky *et al.*, 1994), é um aspecto a ser explorado futuramente nos casos de infecção por serovar F, para confirmação da associação deste serovar com o síndrome clínico acima mencionado (Workowsky *et al.*, 1994).

Como conclusão final, parece-nos que é de toda a urgência a confirmação da elevada prevalência de *C. trachomatis* nas idades entre os 15 e os 25 anos e a enorme diferença entre este grupo etário e outros, efectuar estudos de prevalência no sexo masculino e rapidamente estabelecer um programa de rastreio nestas idades, com vista à diminuição da mortalidade e morbilidade que lhes estão associadas, diminuindo assim os custos psicológicos, físicos e financeiros resultantes da infecção por *C. trachomatis*.

## VII- Bibliografia

- 1- ALBRECHT, M., SHARMA, C. M., REINHARDT, R., VOGEL, J. & RUDEL, T., 2010. Deep sequencing-based discovery of the *Chlamydia trachomatis* transcriptome. *Nucleic Acids Research*, **38**(3): 868-877
- 2- BALA, M. & SOOD, S., 2010. Cephalosporin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Global Infectious Diseases*. **2**(3):284-290
- 3- BANDEA, C. I., DEBATTISTA, J., JOSEPH, K., IGIETSEME, J., TIMMS, P. & BLACK, C. M., 2008. *Chlamydia trachomatis* Serovars among Strains Isolated from Members of Rural Indigenous Communities and Urban Populations in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**(1): 355-356
- 4- BATTEIGER, B. E., LENNINGTON, W., NEWHALL, W. J., KATZ, B. P. & MORRINSON, H. T., 1987. Correlation of infecting serovar and local inflammation in genital chlamydial infections. *The Journal of Infectious Diseases*, **160**(2): 332-336
- 5- BERNSTEIN, K., CHOW, J., RUIZ, J., SCHACHTER, J., HOROWITZ, E., BUNNELL, R. & BOLAN, G., 2006. *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections Among Men and Women Entering California Prisons. *American Journal of Public Health*, **96**(10): 1862-1866
- 6- BLACK, C. M., 1997. Current Methods of Laboratory Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, **10**(1): 160-184
- 7- BILARDI, J.E., DE GUINGAND, D.L., TEMPLE-SMITH, M.J., GARLAND, S., FAIRLEY, C.K., GROVER, S., WALLACE, E., HOCKING, J.S., TABRIZI, S., PIROTTA, M. & CHEN, M.Y., 2010. Young pregnant women's views on the acceptability of screening for Chlamydia as

part of routine antenatal care. *BMC Public Health*, Disponível em:  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2458/10/505>

- 8- Biomerieux, 2003. Manual de Meios de Cultura e Suplementos-2003. Marcy- l'Etoile. França
- 9- BONTIS, J., VAVILIS, D., PANIDIS, D., THEODORIDIS, T., KONSTANTINIDIS, T. & SIDIROPOULOU, A., 1994. Detection of *Chlamydia trachomatis* in asymptomatic women: relationship to history, contraception, and cervicitis. *Advances in Contraception*, **10**(4):309-15
- 10- BORREGO, M. J., GOMES, J. P., LEFEBVRE, J. F., EB, F., ORFILA, J. & CATRY, M. A., 1997. Genotyping of Portuguese *Chlamydia trachomatis* urogenital isolates. *Genitourinary Medicine*, **73**: 561-563
- 11- BRITO DE SÁ, A., GOMES, J. P., VIEGAS, S., FERREIRA, M. A., PAULINO, A. & CATRY, M. A., 2002. Genital infection by *Chlamydia trachomatis* in Lisbon: prevalence and risk markers. *Oxford University Press*, **19**(14): 362-364
- 12- BUSH, R. M. & EVERETT, D. E., 2001. Molecular Evolution of the *Chlamydiaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**:203-220
- 13- CALDWELL, H., WOOD, H., CRANE, D., BAILEY, R., JONES, R., MABEY, D., MACLEAN, I., MOHAMMED, Z., PEELING, R., ROSHICK, C., SCHACHTER, J., SOLOMON, A., STAMM, W., SUCHLAND, R., TAYLOR, L., WEST, S., QUINN, T., BELLAND, R. & MCCLARTY, G., 2003. Polymorphisms in *Chlamydia trachomatis* tryptophan synthase genes differentiate between genital and ocular isolates. *The Journal of Clinical Investigation*, **111**(11): 1757- 1769
- 14- CARDER, C., MERCEY, D. & BENN, P., 2006. *Chlamydia trachomatis*. *Sexually transmitted Infections*, **82**(IV): 10-12

- 15- CASTRO, R., BAPTISTA, T., VALE, A., NUNES, H., PRIETO, E., ARAÚJO, C., MANSINHO, PEREIRA, F., 2010. Lymphogranuloma venereum serovar L2b in Portugal. *International Journal of STD & AIDS*, **21**: 265-266
- 16- CATRY, M. A., BORREGO, M. J., CARDOSO, J., AZEVEDO, J. & SANTO, I., 1995. Comparision of the Amplicor *Chlamydia trachomatis* test and cell culture for the detection of urogenital chlamydial infections. *Genitourinary Medicine*, **71**: 247- 250
- 17- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION OF ATLANTA, 1993. Morbidity and Mortality Weekly Report- Recommendations for the Prevention and Management of *Chlamydia trachomatis* Infections, 1993. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00021622.htm>
- 18- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION OF ATLANTA, 2002. Morbidity and Mortality Weekly Report- Screening Tests To Detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections- 2002. Disponível em: <http://www.cdc.gov/STD/LabGuidelines/rr5115.pdf>
- 19- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION OF ATLANTA, 2006. Morbidity and Mortality Weekly Report- Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2006. Disponível em: <http://www.cdc.gov/STD/LabGuidelines/rr5115.pdf>
- 20- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION OF ATLANTA, 2010. Morbidity and Mortality Weekly Report- Summary of Notifiable Diseases- United State, 2008. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm5754.pdf>
- 21- CHERNESKY, M. A., 2005. The laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis*- Canadian STI best practice laboratory guidelines. *Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, **16**(1): 39-44

- 22- CHERNESKY, M.A. & MAHONY, J.B., 1999. Molecular Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infections by Probe Hybridization, PCR, LCR, TMA and Q- $\beta$  Replicase. **3**:33-46 in “Sexually Transmitted Diseases- Methods and Protocols”. Humana Press. PEELING, R.W. & SPARLING, P.F.
- 23- COOK, R. L., HUTCHLSON, S. L., OSTERGAARD, L., BRALTHWALTE, R. S. & NESS, R. B., 2005. Systematic Review: Noninvasive Testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Annals of Internal Medicine*, **142**: 914-925
- 24- COSTA, J. B., 2009. Infecções Sexualmente Transmissíveis em Adolescentes.Tese apresentada para a obtenção do grau de Doutorado em Microbiologia Médica. Págs 186. Unidade de Doenças Sexualmente Transmissíveis- Instituto de Higiene e medicina Tropical. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa
- 25- CRIBB, P., SCAPINI, J. P. & SERRA, E., 2002. One-tube Nested Polymerase Chain Reaction for Detection of *Chlamydia trachomatis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**(6): 897-900
- 26- CROTCHFELT, K., WELSH, L., DEBONVILLE, D., ROSENSTRAUS, M. & QUINN, T., 1997. Detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in Genitourinary Specimens from Men and Women by a Coamplification PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**(6): 1536-1540
- 27- CULLER, E., CALIENDO, A. & NOLTE, F., 2003. Reproducibility of Positive Test Result in the BDProbeTec ET System for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**(8): 3911-3914
- 28- DEAN, D., 1999. Genotyping *Chlamydia trachomatis* by PCR. **10**:151-163 in “Sexually Transmitted Diseases- Methods and Protocols”. Humana Press. PEELING, R.W. & SPARLING, P.F.

- 29- DEAN, D., OUDENS, E., BOLAN, G., PADIAN, N. & SCHACHTER, J., 1995. MOMP variants of *Chlamydia trachomatis* are associated with severe upper genital tract infections and histopathology in San Francisco. *The Journal of Infectious Diseases*, **172**(4): 1013-1022
- 30- DEAN, D., WILLIAM, J.B., WAN, R., GOMES, J.P., DEVIGNOT, S. & MEHARI, T, 2009. “Predicting Phenotype and Emerging Strains among *Chlamydia trachomatis* Infections” *Emerging Infectious Diseases*. **15**(9): 1385-1394
- 31- EUROPEAN CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2008. Technical Report-Review of *Chlamydia trachomatis* Control Activities in EU Countries. Disponível em: [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0805\\_TER\\_Review\\_of\\_Chlamydia\\_Control\\_Activities.pdf](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0805_TER_Review_of_Chlamydia_Control_Activities.pdf)
- 32- EUROPEAN CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2009. ECDC Guidance- Chlamydia control in Europe. Disponível em: [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0906\\_GUI\\_Chlamydia\\_Control\\_in\\_Europe.pdf](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0906_GUI_Chlamydia_Control_in_Europe.pdf)
- 33- EVERETT, K. D. E., BUSH, R. M. & ANDERSEN, A. A., 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **49**: 415-440
- 34- EXPOSTO, F., 2000. *Neisseria*. **6**: 75-83 In *Microbiologia* Volume 2-Canas Ferreira, W & Sousa, J. Lidel, Porto

- 35- FALLON, R.J. & YOUNG, H., 1993. Neisseria, Branhamella e outras Neisseriácea. **21**:536-540 in “Microbiologia Médica” 6ªedição. C OLLEE, J.G., DUGUID, J.P., FRASER, A.G. & MARMION, B.P. Fundação Calouste Gulbenkian
- 36- FARENCENA, A., COMANDUCCI, M., DONATI, M., RATTI, G. & CEVENINI, R., 1997. Characterization of a New Isolate of *Chlamydia trachomatis* which Lacks the Common Plasmid and has Properties of Trachoma Biovar. *Infection and Immunity*, **65**(7): 2965-2969
- 37- FRENCH, P., ISON, C. A. & MACDONALD, N., 2005. Lymphogranuloma venereum in the United Kingdom. *Sesually Transmited Infections Journal*, **81**(2): 97-98
- 38- GALARZA, P.G., ABAD, R., CANIGIA, L.F., BUSCEMI, L., IRENE, P. & VÁZQUEZ, J.A., 2010. New Mutation in 23S rRNA Gene Associated with High Level of Azithromycin Resistance in Neisseria gonorrhoeae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **54**(4): 1652-1653
- 39- GAYDOS, C.A. & QUINN, T.C., 1999. Detection and Typing by Probe Hybridization, LCR and PCR. **2**:15-29 in “Sexually Transmitted Diseases- Methods and Protocols”. Humana Press. PEELING, R.W. & SPARLING, P.F.
- 40- GHUYSEN, JM. & GOFFIN, C., 1999. Minireview: Lack of Cell Wall Peptidoglycan versus Penicillin Sensitivity: New Insights into the Chlamydial Anomaly. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, **43**(10): 2339-2344
- 41- GOLDEN, M. R., ASTETE, S. G., GALVAN, R., LUCCHETTI, A., SANCHEZ, J., CELUM, C. L., WHITTINGTON, W., STAMM, W., HOLMES, K. & TOTTEN, P., 2003. Pilot Study of COBAS PCR and Ligase Chain Reaction for Detection of Rectal Infections Due to *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**(5): 2174-2175

- 42- HADGU, A. & STERNBERG, M., 2009. Reproducibility and specificity concerns associated with nucleic acid amplification tests for detecting *Chlamydia trachomatis*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **8**: 9-15
- 43- HALIOUA, B., BOHBOT, J.M., MONFORT, L., NASSAR, N., BARBEYRAC, B., MONSONEGO, J. & SEDNAOUI, P., 2006. Ano-Rectal lymphogranuloma venereum: 22 cases reported in a Sexually Transmitted Infections center in Paris. *European Journal of Dermatology*, **16**(2): 177-180
- 44- HERRMANN, B., TÖRNER, A.; LOW, N., KLINT, M., NILSSON, A., VELICKO, I., SÖDERBLOM, T. & BLAXHULT, A., 2008. Emergence and Spread of *Chlamydia trachomatis* Variant, Sweden. *Emerging Infectious Diseases*, **14**(9): 1462-1465
- 45- HITTI, J. & WATTS, D.H., 2008. Bacterial Sexually Transmitted Infections in Pregnancy. **80**:1529-1562 in “Sexually Transmitted Diseases” 4<sup>th</sup> edition McGrawHill, HOLMES, K. K., SPARLING, P. F., STAMM, W. E., PIOT, P., WASSERHEIT, J. N., COREY, L., COHEN, M. S. & WATTS, D. H.
- 46- HJELMEVOLL, S., OLSEN, M., SOLLID, J., HAAHEIM, H., UNEMO, M. & SKOGEN, V., 2006. A Fast Real-Time Polymerase Chain Reaction Method for Sensitive and Specific Detection of the *Neisseria gonorrhoeae* porA pseudogene. *Journal of Molecular Diagnostics*, **8**(5): 574-581
- 47- HO, B.S.W., FENG, W.G., WONG, B.K.C. & EGGLESTONE, S.I., 1992. Polymerase chain reaction for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in clinical samples. *Journal of Clinical Pathology*, **45**:439-442
- 48- HOOK, E.W. & HANDSFIELD H.H., 2008. Gonococcal Infections in the Adult. **35**: 627-645 in “Sexually Transmitted Diseases” 4<sup>th</sup> edition McGrawHill, HOLMES, K. K., SPARLING, P.



F., STAMM, W. E., PIOT, P., WASSERHEIT, J. N., COREY, L., COHEN, M. S. & WATTS, D. H.

- 49- IKEHATA, M., NUMAZAKI, K. & CHIBA, S., 2000. Analysis of *Chlamydia trachomatis* serovars in endocervical specimens derived from pregnant Japanese Women. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **27**: 35-41
- 50- JALAL, H., STEPHEN, H., AL-SWAINE, A., SONNEX, C. & CARNE, C., 2006. The superiority of polymerase chain reaction over an amplified enzyme immunoassay for the detection of genital chlamydial infections. *Sexually Transmitted Infections*, **82**: 37-40
- 51- JALAL, H., STEPHEN, H., CURRAN, M. D., BURTON, J., BRADLEY, M. & CARNE, C., 2006. Development and Validation of a Rotor- Gene Real-Time PCR Assay for Detection, Identification, and Quantification of *Chlamydia trachomatis* in a Single Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**(1): 206-213
- 52- JASCHEK, G., GAYDOS, C., WELSH, L. & QUINN, T., 1993. Direct Detection of *Chlamydia trachomatis* in Urine Specimens from Symptomatic and Asymptomatic Men by Using a Rapid Polymerase Chain Reaction Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **31**(5): 1209-1212
- 53- JURSTRAND, M., CHRISTERSON, L., KLINT, M., FREDLUND, H., UNEMO, M. & HERRMANN, B., 2010. Characterisation of *Chlamydia trachomatis* by ompA sequencing and multilocus sequence typing in a Swedish county before and after identification of the new variant. *Sexually Transmitted Infections*, **86**: 56-60
- 54- KAKAR, S., BHALLA, P., MARIA, A., RANA, M., CHAWLA, R. & MATHUR, N.B., 2010. *Chlamydia trachomatis* causing neonatal conjunctivitis in a tertiary care center. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **28**: 45-7

- 55- KOHLHOFF, S.A. & HAMMERSCHLAG, M.R., 2008. Gonococcal and Chlamydial Infections in Infants and Children. **83**:1613-1628 in “Sexually Transmitted Diseases” 4<sup>th</sup> edition McGrawHill, Holmes, K. K., Sparling, P. F., Stamm, W. E., Piot, P., Wasserheit, J. N., Corey, L., Cohen, M. S. & Watts, D. H.
- 56- KROPP, R. Y. & WONG, T., 2005. Emergence of lymphogranuloma venereum in Canada. *Canadian Medical Association Journal*, **172**: 1674-1676
- 57- KUČINSKIENĖ, V., ŠUTAITĖ, I., VALIUKEVIČIENĖ, S., MILAŠAUSKIENĖ, Ž. & DOMEIKA, M., 2006. Prevalence and risk factors of genital *Chlamydia trachomatis* infection. *Journal Medicina (Kaunas)*, **42**(10): 885-894
- 58- LANIGAN- O’KEEFE, F. M., 1974. Letter: Prepubertal gonorrhoea. *The British Journal of Venereal Diseases*, **50**(5): 381
- 59- MACDONALD, N., ISON, C., MARTIN, I., ALEXANDER, S., LOWNDES, C., SIMMS, I. & WARD, H., 2005. Initial results of enhanced surveillance for lymphogranuloma venereum (LGV) in England. *Eurosurveillance*, **10**(1)
- 60- MAGALHÃES, Z., 2010. Infecção por *Chlamydia trachomatis*: Conhecimentos, Atitudes e Práticas de uma População de Estudantes Universitários das Áreas da Saúde. Tese apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade em Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional. Págs 171. Unidade de Doenças Sexualmente Transmissíveis- Instituto de Higiene e medicina Tropical. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa
- 61- MAGALHÃES SANTA’ANA, A., 2000. *Chlamydia*. **21**: 203-216 In Microbiologia Volume 2- Canas Ferreira, W & Sousa, J. Lidel, Porto
- 62- MAHONY, J., CHONG, S., JANG, D., LUINSTR, K., FAUGHT, M., DALBY, D., SELLORS, J. & CHERNESKY, M., 1998. Urine Specimens from Pregnant and Nonpregnant

Women Inhibitory to Amplification of *Chlamydia trachomatis* Nucleic Acid by PCR, Ligase Chain Reaction, and Transcription- Mediated Amplification: Identification of Urine Substances Associated with Inhibition and Removal of Inhibitory activity. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**(11): 3122-3126

- 63- MILLMAN, K., BLACK, C. M., JOHNSON, R. E., STAMM, W. E., JONES, R. B., HOOK, E. W., MARTIN, D. H., BOLAN, G., TAVARÉ, S. & DEAN, D., 2004. Population- Based Genetic and Evolutionary Analysis of *Chlamydia trachomatis* Urogenital Strain Variation in the United States. *Journal of Bacteriology*, **186**(8): 2457-2465
- 64- MOULDER, J., 1993. Why is *Chlamydia* sensitive to penicillin in the absence of peptidoglycan?. *Infectious Agents and Disease*, **2**(2): 87-99
- 65- NÄHER, H. & PETZOLDT, D., 1991. Serovar distribution of Urogenital *Chlamydia trachomatis* isolates in Germany. *Genitourinary Medicine*, **67**: 114-116
- 66- NYÁRI, T., DEÁK, J., NAGY, E., VERÉB, I., KOVÁCS, L., MÉSZÁROS, G., ORVOS, H., BERBIK, I., 1998. Epidemiological study of *Chlamydia* infections in pregnant women in Hungary. *Sexually Transmitted Infections*, **74**: 213-215
- 67- OLIVEIRA, M. L., AMORIM, M. M. R., SOUZA, P. R. E., ALBUQUERQUE, L. C. B., BRANDÃO, L. A. C. & GUIMARÃES, R. L., 2008. *Chlamydia* Infection in Patients With and Without Cervical Intra-Epithelial Lesions Tested by Real-Time PCR vs. Direct Immunofluorescence. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, **12**: 324-328
- 68- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2001. Global prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections- Overview and estimates. Disponível em: [http://www.who.int/hiv/pub/sti/en/who\\_hiv\\_aids\\_2001.02.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/sti/en/who_hiv_aids_2001.02.pdf)

- 69- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007. Global Strategy for the Prevention and Control of Sexually Transmitted Infections: 2006-2015. Disponível em: [http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/RHR\\_06\\_10/en/index.html](http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/RHR_06_10/en/index.html)
- 70- PETERSON, E. M., MARKOFF, B. A., SCHATER, J. & MAZA, L. M., 1990. The 7.5-kb plasmid present in *Chlamydia trachomatis* is not essential for the growth of this microorganism. *Plasmid*, **23**(2):144-148
- 71- QUINN, T., WELSH, L., LENTZ, A., CROTCHFELT, K., ZENILMAN, J., NEWHALL, J. & GAYDOS, C., 1996. Diagnosis by Amplicor PCR of *Chlamydia trachomatis* Infection in Urine Samples from Women and Men Attending Sexually Transmitted Disease Clinics. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**(6): 1396-1400
- 72- QUINT, K., DOORN, L., KLETER, B. & KONING, M. N. C., 2007. A Highly Sensitive, Multiplex Broad- Spectrum PCR-DNA-Enzyme Immunoassay and Reverse Hybridization Assay for Rapid Detection and Identification of *Chlamydia trachomatis* Serovars. *Journal of Molecular Diagnostics*, **19**(5): 631- 638
- 73- QUINT, K., PORRAS, C., SAFAEIAN, M., GONZÁLEZ, P., HILDESHEIM, A., QUINT, W., DOORN, L., SILVA, S. & MELCHERS, W., 2007. Evaluation of a Novel PCR- Based Assay for Detection and Identification of *Chlamydia trachomatis* Serovars in Cervical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**(12): 3986-3991
- 74- RADCLIFFE, K., 2001. European STD Guidelines. *International Journal of STD&AIDS*, **12**(3): 27-33
- 75- REISCHL, U., STRAUBE, E. & UNEMO, M., 2009. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis* (nvCT) remains undetected by many European laboratories as revealed in the recent PCR/NAT ring trial organized by INSTAND e.v., Germany. *Eurosurveillance*, **14**(32): 1-4

- 76- SCHACHTER, J. & STEPHENS, R.S., 2008. Biology of *Chlamydia trachomatis*. **31**:555-574 in “Sexually Transmitted Diseases” 4<sup>th</sup> edition McGrawHill, Holmes, K. K., Sparling, P. F., Stamm, W. E., Piot, P., Wasserheit, J. N., Corey, L., Cohen, M. S. & Watts, D. H.
- 77- SINGH, V., SALHAN, S., DAS, B. C. & MITTAL, A., 2003. Predominance of *Chlamydia trachomatis* Serovars Associated with Urogenital Infections in Females in New Delhi, India. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**(6): 2700-2702
- 78- SKJELDESTAD, F. E., NORDBØ, S. A. & HADGU, A., 1997. Sentinel surveillance of *Chlamydia trachomatis* infection in women terminating pregnancy. *Genitourinary Med*, **73**: 29-32
- 79- SPARLING, P.F., 2008. Biology of *Neisseria gonorrhoeae*. **34**:607-626 in “Sexually Transmitted Diseases” 4<sup>th</sup> edition McGrawHill, Holmes, K. K., Sparling, P. F., Stamm, W. E., Piot, P., Wasserheit, J. N., Corey, L., Cohen, M. S. & Watts, D. H.
- 80- SRIFEUNGFUNG, S., ROONGPISUTHIPONG, A., ASAVAPIRIYANONT, S., LOLEKHA, R. & TRIBUDDHARAT, C., 2009. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in HIV- Seropositive Patients and Gonococcal Antimicrobial Susceptibility: an update in Thailand. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **62**: 467-470
- 81- STAMM, W.E., 2008. *Chlamydia trachomatis* Infections of the Adult. **32**:575-593 in “Sexually Transmitted Diseases” 4<sup>th</sup> edition McGrawHill, Holmes, K. K., Sparling, P. F., Stamm, W. E., Piot, P., Wasserheit, J. N., Corey, L., Cohen, M. S. & Watts, D. H.
- 82- STARK, D., HAL, S., HILLMAN, R., HARKNESS, J. & MARRIOTT, D., 2007. Lymphogranuloma Venereum in Australia: Anorectal *Chlamydia trachomatis* Serovar L2b in Men Who Have Sex with Men. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**(3): 1029-1031

- 83- STEVENS, M. P., TABRIZI, S. N., MULLER, R., KRAUSE, V. & GARLAND, S. M., 2004. Characterization of *Chlamydia trachomatis* omp1 Genotypes Detected in Eye Swab Samples from Remote Australian Communities. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**(6): 2501-2507
- 84- STOTHARD, D. R., WILLIAMS, J. A., VAN DER POL, B. & JONES, R., 1998. Identification of a *Chlamydia trachomatis* Serovar E Urogenital Isolate Which Lacks the Cryptic Plasmid. *Infection and Immunity*, **66**(12): 6010-6013
- 85- TAKAHASHI, S., YAMASAKI, T., SATOH, K., INOUE, M., TAKAHASHI, S., ISHIHARA, O., OKA, Y., HORIGUCHI, Y., OKUWAKI, Y., SUZUKI, S. & KISHIMOTO, T., 2007. Longitudinal Epidemiology of *Chlamydia trachomatis* Serovars in Female Patients in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **60**: 374-376
- 86- TJADEN, J., WINKLER, H.H., SCHWÖPPE, C., LAAN, M., MÖHLMANN, T. & NEUHAUS, H., 1999. Two Nucleotide Transport Proteins in *Chlamydia trachomatis*, One for Net Nucleoside Triphosphate Uptake and the Other for Transport of Energy. *Journal of Bacteriology*, **181**(4): 1196-1202
- 87- TOYE, B., PEELING, R., JESSAMINE, P., CLAMAN, P. & GEMMILL, I., 1996. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infections in Asymptomatic Men and Women by PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**(6): 1401-1406
- 88- TSAI, H. Y., WAN, C., TESENG, C. C., 2006. Childhood vulvovaginitis: report of two cases. *Acta Paediatrica Taiwanica*, **47**(1): 43-6
- 89- VALKENGOED, I., POSTMA, M. & MORRÉ, S., 2001. Cost effectiveness analysis of a population based screening programme for asymptomatic *Chlamydia trachomatis* infections in women by means of home obtained urine specimens. *Sexually Transmitted Infections*, **77**: 276-282

- 90- WAALBOER, R., VAN DER SNOEK, E. M., VAN DER MEIJDEN, W. I., MULDER, P. G. H. & OSSEWAARDE, J. M., 2006. Analysis of rectal *Chlamydia trachomatis* serovar distribution including L2 (lymphogranuloma venereum) at Erasmus MC STI clinic, Rotterdam. *Sexually Transmitted Infections*, **82**: 207- 211
- 91- WILSON, J., HONEY, E., TEMPLETON, A., PAAVONEN, J., MARDH, P., STARY, A. & PEDERSEN, B., 2002. A systematic review of the prevalence of *Chlamydia trachomatis* among European Women. *Human Reproduction Update*, **8**(4): 385-394
- 92- WHILEY, D.M., BUDA, P.J., BAYLISS, J., COVER, L., BATES, J. & SLOOTS, T.P., 2004. A new confirmatory *Neisseria gonorrhoeae* real-time PCR assay targeting the *porA* pseudogene. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **23**:705-710
- 93- WORKOWSKY, K.A., STEVENS, C.E., SUCHLAND, R.J., HOLME, K.K., ESCHENBACH, D.A., PELTINGER, M.B. & STAMM, W.E., 1994. Clinical manifestations of genital infections due to *Chlamydia trachomatis* in women: differences related to serovar. *Clinical Infectious Diseases*, **19**(4): 756-760
- 94- YAMASAKI, T., HAGIWARA, T., KISHIMOTO, T., SASAKI, N., TAKAHASHI, S., ISHIHARA, O., WANGROONGSARB, P., KUSUM, M. & SIRIVONGRANGSAN, P., 2005. Distribution of *Chlamydia trachomatis* Serovars among Females Prostitutes and Non-Prostitutes in Thailand, an Non-Prostitutes in Japan during the Mid-90s. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **58**: 211-213
- 95- YOUNG, H., MANAVI, K. & MCMILLAN, A., 2003. Evaluation of ligase chain reaction for the non-cultural detection of rectal and pharyngeal gonorrhoea in men who have sex with men. *Sexually Transmitted Infections*, **79**:484-486

- 96- YUAN, Y., ZHANG, Y., WATKINS, N. & CALDWELL, H., 1989. Nucleotide and Deduced Amino acid Sequences for the Four Variable Domains of the Major Outer Membrane Proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* Serovars. *Infection and Immunity*, **57**(4): 1040-1049
- 97- ZHENG, H., JIANJ, L., FAND, D., XUE, Y., WU, Y., HUANG, J. & OU, Z., 2006. Application of an Oligonucleotide array assay for rapid detecting and genotyping of *Chlamydia trachomatis* from urogenital specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **57**:1-6



## VII- Anexos

## Anexo A- Consentimento Informado

Olá futura - Mãe,

Existem doenças contagiosas muito comuns entre as mulheres e o seus parceiros que podem ser transmitidas ao seu bebé. É o caso das infecções a *Chlamydia trachomatis* e a *Neisseria gonorrhoeae*. Estas doenças não causam sintomas nas mães, mas podem causar conjuntivite e infecção respiratória nos bebés.

Por esse motivo, de forma a poder identificar e tratar mães e bebés, este hospital está a realizar um projecto para o qual pedimos a sua colaboração.

Estes dois microrganismos, não causam sintomas nas mães, mas podem causar conjuntivite e/ou infecção respiratória nos bebés.

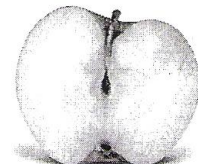
Para participar neste grande projecto, basta responder a um simples questionário, totalmente sigiloso e autorizar a colheita de urina e exsudado vaginal durante a consulta de referência entre as 35 e 37 semanas de gravidez.

Lembramos que todas as informações dadas serão apenas usadas para investigação científica.

Para nos assegurarmos de que tudo está bem consigo e com o seu bebé, durante os 3 meses que se seguem ao parto, é da maior importância que os contactos fornecidos estejam devidamente actualizados.

A sua participação neste projecto irá ajudar a cumprir o nosso principal objectivo que é cuidar bem de si e do seu bebé!

Muito obrigada pela sua colaboração.



Cristina Isabel dos Santos Paixão Lobato

2010

## Consentimento informado

### Introdução

A infecção a *Chlamydia trachomatis* é a infecção genital bacteriana de transmissão sexual mais frequente na mulher. O colo uterino é o local primário para a infecção, sendo frequente em mulheres jovens e sexualmente activas. A maioria destas infecções é assintomática e diagnosticada apenas por procedimentos de rastreio; cerca de 5-37% das mulheres estão infectadas

Na grávida, a colonização do colo do útero assintomática ocorre com uma frequência de 2 a 20%.

É controversa a associação da infecção a *Chlamydia* com complicações na gravidez, embora tenham sido referidos abortos espontâneos, parto prematuro, baixo peso ao nascer, morte fetal e infecção uterina pós-parto e pós-aborto. A infecção (endometrite) pós-parto ocorre sobretudo 2-3 semanas após o parto. Outras complicações na grávida são: a doença inflamatória pélvica, dor pélvica crónica, infertilidade, gravidez extra-uterina.

A transmissão mãe/filho durante o parto ocorre em 40-70% dos partos vaginais. Nos recém-nascidos em cerca de 25-50%, a infecção localiza-se na faringe e nasofaringe, 20% no intestino com eliminação de *Chlamídias* nas fezes e 10-20% dos RN do sexo feminino têm esfregaços vaginais positivos.

O recém nascido pode apresentar conjuntivite (30-50%) com um período de incubação de 5 a 14 dias; pneumonia (20%,) que habitualmente surge entre 4 e as 12 semanas.

Em Portugal, a infecção por *Chlamydia* não é de declaração obrigatória, pelo que não se conhece a sua prevalência no adulto ou no recém-nascido. No entanto, num estudo efectuado em consultas de planeamento familiar, a prevalência deste microorganismo foi de cerca de 5%.

Assim pretende-se:

- 1 -Determinar a prevalência da infecção por *C. trachomatis* nas grávidas do Hospital Fernando Fonseca.
- 2 - Determinar a prevalência e caracterizar o tipo de infecção por *Chlamydia trachomatis* nos recém-nascidos das grávidas infectadas.
- 3 - Avaliar a necessidade da implementação dum rastreio sistemático das grávidas deste Hospital, tendo como base a prevalência de infecções nas grávidas e seus recém – nascidos, encontrada neste estudo.

Uma vez que a infecção gonócocica está por vezes associada à infecção por *Chlamydia* pretende-se também determinar a prevalência desta infecção.

Este estudo será efectuado às grávidas referenciadas à Consulta de Obstetrícia do Hospital Fernando Fonseca entre as 35 e 37 semanas de gravidez e Sala de Partos em caso de gravidez não vigiada; assim como aos recém-nascidos filhos de grávidas infectadas. Decorrerá durante um período de 6 meses, início a 15 de Maio de 2009.

O estudo consiste no preenchimento de um inquérito confidencial e em procedimentos clínicos que permitirão diagnosticar o seu estado de infecção.

## **GRÁVIDAS**

### **Procedimentos clínicos**

#### **A - CONSULTA DE REFERÊNCIA ENTRE AS 35 E 37 SEMANAS DE GRAVIDEZ:**

1. Colheita de urina para pesquisa de *C. trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*  
Colheita do primeiro jacto de urina (20 - 50ml), estando pelo menos uma hora sem urinar.
2. Colheita de exsudado cervical para cultura, identificação e teste de sensibilidade aos antibióticos de *Neisseria gonorrhoeae*

#### **B - SALA DE PARTOS EM CASO DE GRAVIDEZ NÃO VIGIADA, ABORTO OU NADO MORTO**

Os procedimentos serão efectuados em todas as grávidas sem rotura de membranas e quando possível nas que se apresentarem após a rotura de membranas.

1. Colheita de urina para PCR para *C. trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*  
Colheita do primeiro jacto de urina (20 - 50ml), estando pelo menos uma hora sem urinar.
2. Colheita de exsudado cervical para cultura, identificação e teste de sensibilidade aos antibióticos de *Neisseria gonorrhoeae*

## **RECÉM-NASCIDOS**

Rastreio da infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* aos recém nascidos filhos de mães com infecção por *C. trachomatis*

### **I - RECÉM-NASCIDOS SINTOMÁTICOS:**

#### **Procedimentos clínicos:**

Para qualquer uma das situações clínicas seguintes, em qualquer altura e até às 4 semanas:

#### **A - Conjuntivite:**

1. Colheita de amostras da conjuntiva.
2. Colheita de sangue

#### **B - Pneumonia:**

1. Colheita de exsudado de aspirados traqueais e/ ou de exsudado nasofaríngeo
2. Colheita de sangue



**II- RECÉM-NASCIDOS ASSINTOMÁTICOS, FILHOS DE MÃES COM INFECÇÃO POR *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* E/OU *NEISSERIA GONORRHOEAE***

**Procedimentos clínicos:**

**1. Recém nascidos assintomáticos de mães com infecção por *Neisseria gonorrhoeae***  
Na altura do parto efectuar zaragatoa da conjuntiva.

**2. Recém nascidos assintomáticos de mães com infecção por *Chlamydia trachomatis***  
Às 2 e às 4 semanas de vida efectuar história clínica e colheita de sangue para pesquisa de anticorpos.  
Se a pesquisa de anticorpos for positiva às 2 semanas:  
Colheita de exsudado ocular .  
Se a pesquisa de anticorpos for positiva às 4 semanas:  
Colheita de aspirados traqueais para tubo seco e/ou de exsudado nasofaríngeo e/ou de exsudado da conjuntiva com zaragatoa.

A todas as grávidas infectadas e seu parceiro sexual será efectuado tratamento, assim como aos recém-nascidos  
.Após o tratamento se se tratou de infecção gonocócica far-se-à colheita de exsudado cervical após 2 semanas ; caso a infecção seja a *Chlamydia* repete-se a colheita de urina após 4 semanas e novamente após 3 meses

Este estudo é independente, não tendo os investigadores qualquer remuneração adicional e efectuado em colaboração com Hospital Fernando Fonseca (Departamento de Pediatria, Serviço de Obstetrícia, Serviço de Patologia Clínica) e Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

Aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Fernando Fonseca

Aceito participar no estudo, tendo-me sido explicado bem como lido este consentimento informado

Assinatura da Grávida e do pai

Investigador

Data

Cristina Isabel dos Santos Paixão Lobato

2010

## Anexo B- Inquérito às grávidas

### INQUÉRITO GRÁVIDA

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### Processo

#### História pregressa

Relação estável sim não  
 Nº de parceiros nos últimos 6 meses \_\_\_\_  
 Sexo: feminino \_\_\_\_ masculino \_\_\_\_ ambos \_\_\_\_ (dos parceiros sexuais)  
 Uso de preservativo? \_\_\_\_ (sim/não)  
 Gestações \_\_\_\_ Partos \_\_\_\_ Abortos espontâneos \_\_\_\_ provocados \_\_\_\_

#### História Clínica Actual

Data contacto sexual suspeito \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Assintomático \_\_\_\_ Sintomático \_\_\_\_ Data início de sintomas \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### Observação Clínica

|                      |                          |                 |                          |                    |                          |       |                          |
|----------------------|--------------------------|-----------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|-------|--------------------------|
| Corrimento vaginal   | <input type="checkbox"/> | Prurido vaginal | <input type="checkbox"/> | Prurido cutâneo    | <input type="checkbox"/> | Febre | <input type="checkbox"/> |
| Úlceras vaginais     | <input type="checkbox"/> | Dor abdominal   | <input type="checkbox"/> | Vesículas genitais | <input type="checkbox"/> |       | <input type="checkbox"/> |
| Adenopatias genitais | <input type="checkbox"/> | Erupção cutânea | <input type="checkbox"/> | Artralgias         | <input type="checkbox"/> |       | <input type="checkbox"/> |

Terapêutica Antibiótica: não sim data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ especifique

#### Produtos colhidos

#### Resultado Laboratoriais:

VIH1 \_\_\_\_ VIH2 \_\_\_\_ AgHBs \_\_\_\_ Outro \_\_\_\_

VDRL \_\_\_\_ TPHA \_\_\_\_

*Neisseria gonorrhoeae* - Cultura \_\_\_\_ TSA \_\_\_\_

*Chlamydia trachomatis* - IF \_\_\_\_ PCR \_\_\_\_

Micoplasmas sp. - Cultura \_\_\_\_ PCR \_\_\_\_